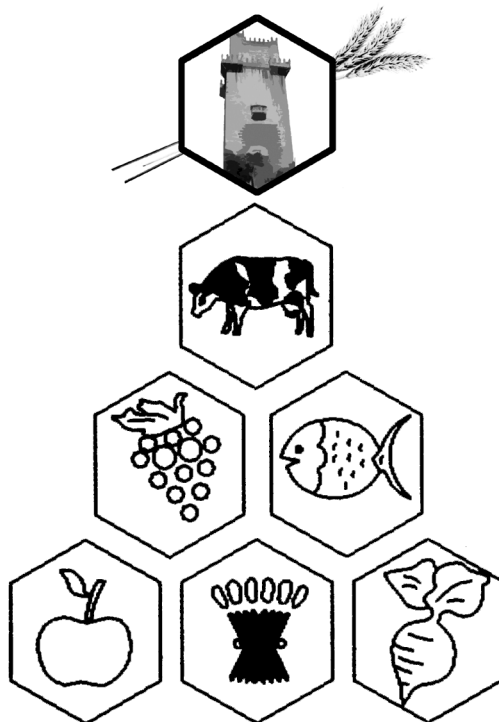


# **ACTAS DO 8º ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS**



## **Alimentos Tradicionais, Alimentos Saudáveis e Rastreabilidade**

**Beja, Março 2007**

**Instituto Politécnico de Beja  
Escola Superior Agrária de Beja  
Sociedade Portuguesa de Química**

## Ficha Técnica

---

Actas do 8º Encontro de Química dos Alimentos

Editores: Silvina Ferro Palma

João Canada

João Dias

Sandra Palma Ferro

Nuno Bartolomeu Alvarenga

ISBN: 978-972-95296-4-1 (E. S. A. B.)

ISBN: 978-972-99080-9-5 (S. P. Q.)

Impressão: GTO 2000, Soc. de Artes Gráficas, Lda. - Bombarral

Depósito Legal:

Ano 2007

Tiragem: 500 exemplares

---

Esta publicação reúne as comunicações apresentadas no 8º Encontro de Química dos Alimentos, sob a forma de Conferências, Comunicações Orais e em Painel.

A aceitação das comunicações foi feita com base nos resumos apresentados: o texto integral que aqui se apresenta é da inteira responsabilidade dos autores

## **Comissão Científica**

---

Dulcineia Ferreira, ESA–IPViseu  
F. Xavier Malcata, ESB–UCPorto  
Irene Silveira, FF–UCoimbra  
Ivonne Delgadillo, UAveiro  
João Canada, ESA – IPBeja  
Jorge Justino, ESA–IPSantarém  
José Empis, UTL, Lisboa  
Maria Leonor Nunes, IPIMAR, Lisboa  
Nídia Bráz, ESS, Faro  
Silvina Ferro Palma, ESA – IPBeja

## **Comissão Organizadora (ADCTA da ESAB)**

---

Anabela Amaral  
Antónia Macedo  
António Almodôvar  
Nuno B. Alvarenga  
Carlos Ribeiro  
Dália Cascalheira  
Isabel Baer  
João Canada  
João Dias  
Manuela Costa  
Maria João B. Carvalho  
Olga Amaral  
Sandra Palma Ferro  
Silvina Ferro Palma  
Teresa Santos

## **Colaboração**

Associação de Estudantes da ESAB



## NOTA DE ABERTURA

A Divisão de Química dos Alimentos da Sociedade Portuguesa de Química, a Comissão Científica e Organizadora saúdam os participantes do 8º Encontro de Química dos Alimentos.

Estes Encontros têm tido lugar, desde 1993, com frequência bienal, em Santarém, Aveiro, Faro, Coimbra, Porto, Lisboa e Viseu, constituindo já uma referência em Portugal, no domínio da Química e da Ciência dos Alimentos.

A Ciência dos Alimentos constitui a base para avaliar a qualidade e segurança dos alimentos, as inovações e as técnicas analíticas. As actividades desenvolvidas pelos químicos de alimentos, influem no bem-estar e saúde da população, ao controlarem a utilização de aditivos, de embalagens, a eliminação de defeitos de fabrico e ao contribuírem para o desenvolvimento de normas alimentares. Assumem assim, a responsabilidade de dirigir e executar tais actividades, uma missão que visa primariamente o benefício da sociedade em geral. Um melhor conhecimento do meio ambiente faz com que, na actualidade e provavelmente no futuro, as questões relativas aos alimentos tenham uma importância crescente. É neste contexto que encontramos motivação para levar a cabo este Encontro com os temas, Alimentos Tradicionais, Alimentos Saudáveis e Rastreabilidade.

Agradecemos a entusiástica colaboração dos autores, portugueses e estrangeiros, que contribuíram para este livro e ainda a todos os que colaboraram e patrocinaram este evento.

Silvina Maia Ferro Palma

A Presidente da Comissão Organizadora



## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. SESSÃO DE ABERTURA .....</b>   | <b>1</b>  |
| A COZINHA DO ALENTEJO .....  | 1         |
| <b>2. ALIMENTOS FUNCIONAIS .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2.1 SESSÃO PLENÁRIA .....</b>   | <b>11</b> |
| LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN EL MUNDO DE HOY .....   | 11        |
| <b>2.2 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS.....</b>   | <b>13</b> |
| BOLACHAS FUNCIONAIS RICAS EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS $\omega$ 3, POR<br>INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Isochrysis galbana</i> .....                                     | 13        |
| BENEFÍCIOS E PERIGOS ASSOCIADOS AOS PRODUTOS DA PESCA .....  | 19        |
| CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO EM FENOL DE MÉIS PORTUGUESES E A RESPECTIVA<br>ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM POLPA DE<br>BANANA E PERA ..... | 25        |
| DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC/UV METHOD FOR QUANTIFICATION OF<br>BIOACTIVE PEPTIDES IN FERMENTED MILKS .....   | 31        |
| <b>2.3 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS DE PAINÉIS .....</b>   | <b>32</b> |
| DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM UVA, POLPA DE UVA E SUCO<br>CONCENTRADO DE UVA POR HPLC .....   | 32        |
| AVALIAÇÃO DE ESTERÓIS E DE ESTANÓIS VEGETAIS EM LEITES E IOGURTES E SUA<br>IMPORTÂNCIA NA REDUÇÃO DA COLESTEROLÉMIA .....  | 33        |
| CHÁ VERDE COMO ALIMENTO FUNCIONAL – ESTUDOS DOS DIFERENTES COMPOSTOS<br>FENÓLICOS E A SUA ESTABILIDADE .....   | 37        |
| PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACÁRIDOS DE DIFERENTES MATERIAIS RICOS EM XILANOS:<br>AVALIAÇÃO DA SUA CAPACIDADE PREBIÓTICA .....   | 45        |
| <b>2.4 PAINÉIS .....</b>   | <b>51</b> |
| ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Lactarius piperatus</i> EM DIFERENTES FASES DE MATURAÇÃO<br>.....  | 51        |
| AVALIAÇÃO DO TEOR EM ALICINA EM POPULAÇÕES REGIONAIS DE ALHO.....  | 55        |
| BETA-CAROTENO E LUTEÍNA EM AZEITES DOP .....   | 59        |
| CAFÉ EXPRESSO: CARACTERIZAÇÃO DO SEU TEOR EM HARMANA E NORHARMANA .....  | 63        |
| COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS E TOCOFERÓIS DO ÓLEO DAS SEMENTES DE <i>Pinus pinea</i> L.<br>.....  | 67        |
| COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS INTERNAS DA COUVE<br>TRONCHUDA.....  | 71        |

|   |            |
|---|------------|
| CONSUMO DE PEIXE: EFEITO NA PREVENÇÃO DA DOENÇA CARDIOVASCULAR .....  | 75         |
| ESTUDO DO APROVEITAMENTO ECONÓMICO DA FIBRA DE <i>Beta vulgaris</i> . AVALIAÇÃO<br>SENSORIAL DE NOVOS SUPLEMENTOS DIETÉTICOS FUNCIONAIS.....  | 76         |
| ESTUDO REOLÓGICO SOBRE A FIBRA DE <i>Psyllium</i> COMO AGENTE GELIFICANTE.....  | 81         |
| LACTIC ACID BACTERIA FROM BLACK AND GREEN OLIVES ARE A RICH SOURCE OF<br>BACTERIOCIN PRODUCERS.....   | 85         |
| OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO PARA NECESSIDADES ESPECÍFICAS –<br>PROJECTO PANXTODOS .....   | 89         |
| OPTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE GELIFICADOS DE MEL ENRIQUECIDOS EM FIBRA .....   | 91         |
| POTENTIAL ANTIOXIDANT CAPACITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF <i>Cynara cardunculus</i><br><i>L.</i> USED AS COAGULANT IN PDO CHEESES .....  | 95         |
| PREPARATION OF FRANKFURT FISH SAUSAGES WITH PROTEINS RECOVERED FROM CAPE<br>HAKE BY-PRODUCTS .....  | 99         |
| PROTEÍNAS DO LACTOSORO DE BOVINO AÇORIANO. AVALIAÇÃO DA ACEITABILIDADE<br>SENSORIAL DE NOVOS ALIMENTOS FUNCIONAIS .....   | 105        |
| <b>3. INOVAÇÃO E ALIMENTOS TRADICIONAIS.....</b>  | <b>109</b> |
| <b>3.1 SESSÃO PLENÁRIA .....</b>  | <b>111</b> |
| PRODUCTOS TRADICIONALES E INNOVACIÓN.....   | 111        |
| <b>3.2 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS.....</b>  | <b>117</b> |
| APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLECTÂNCIA NO<br>INFRAVERMELHO PRÓXIMO ( <i>NIRS</i> ) AO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA GORDURA<br>SUBCUTÂNEA DORSAL DO PORCO ALENTEJANO..... | 117        |
| ESTUDOS SOBRE UM NOVO INIBIDOR DO ABROLHAMENTO: O COMPOSTO DE INCLUSÃO DE<br>$\beta$ -CICLODEXTRINA E S-CARVONA.....  | 123        |
| APLICAÇÃO DE UMA LÍNGUA ELECTRÓNICA NA CLASSIFICAÇÃO DE MÉIS MONOFLORAIS<br>.....   | 129        |
| ESTABELECIMENTO DO PERFIL VOLÁTIL DA MAÇÃ ‘BRAVO DE ESMOLFE’ POR SPME-GC-<br>QMS .....  | 135        |
| <b>3.3 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS DE PAINÉIS.....</b>   | <b>141</b> |
| MICROBIAL ECOLOGY OF TRADITIONAL AZOREAN SOURDOUGH STARTERS – FIRST<br>APPROACH.....  | 141        |
| CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO PRODUTO TRADICIONAL “CHOURIÇA<br>DE CARNE” DE MELGAÇO .....  | 145        |
| OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA<br>DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM ÓLEOS E GORDURAS.....  | 150        |



|   |            |
|---|------------|
| COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>Laurus nobilis</i> .....   | 151        |
| <b>3.4 PAINÉIS .....</b>  | <b>157</b> |
| ACTIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE, ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DE EXTRACTOS DO PIORNO DA MADEIRA.....   | 157        |
| ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO.....   | 161        |
| ANÁLISES POR HS-SPME-GC E HS-SPME-GC-MS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS <i>Calamintha baetica</i> , <i>Thymus mastichina</i> E <i>Origanum vulgare</i> EM DIFERENTES EMBALAGENS .....                         | 165        |
| APLICAÇÃO DA DETECÇÃO ELECTRÓNICA DE AROMAS NA CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES DE AGRICULTURA BIOLÓGICA .....   | 169        |
| CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE QUEIJO SERPA .....  | 173        |
| CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DO LEITÃO DE NEGRAIS, EMBALADO EM ATMOSFERA MODIFICADA .....   | 178        |
| CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÓLISE NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO DO PICO.....   | 179        |
| COMPARAÇÃO DE ALGUNS COMPOSTOS DO AROMA DE AZEITES OBTIDOS POR DOIS MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DIFERENTES .....   | 183        |
| CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE ALGUNS PRODUTOS DE SALSICHARIA .....  | 187        |
| CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA 'ÁGUA MEL', UM PRODUTO TRADICIONAL ALGARVIO .....   | 191        |
| DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM DIFERENTES VARIEDADES E TIPOS COMERCIAIS DE ARROZ.....  | 195        |
| DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO TEOR DE POLIFENÓIS NO CHÁ VERDE DA GORREANA: IMPACTO ECONÓMICO .....   | 199        |
| CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE AZEITES ELEMENTARES DA REGIÃO DE TRÁS-OS-MONTES .....   | 204        |
| EFEITO DA <i>ESTUFAGEM</i> NA COMPOSIÇÃO DO VINHO MADEIRA.....  | 205        |
| ELABORAÇÃO DE DOCES DE CASTANHA .....   | 209        |
| ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DA REGIÃO DO SOTAVENTO ALGARVIO .....  | 213        |
| ESTUDO DA QUALIDADE SENSORIAL DO LOMBO DE NOVILHOS DA RAÇA ALENTEJANA ..  | 215        |
| IMPORTÂNCIA DO PERFIL DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BOLOTA E DA ERVA DA PASTAGEM EXPONTÂNEA DO MONTADO NO MANEIO ALIMENTAR DO PORCO ALENTEJANO ( <i>Sus ibericus</i> )..... | 219        |
| INOVAÇÃO EM ALIMENTOS TRADICIONAIS: A SALSICHA QUE VEIO DO MAR.....   | 223        |

|   |            |
|---|------------|
| OS POLISSACARÍDEOS DAS PAREDES CELULARES DA AMEIXA D'ELVAS E A ACTIVIDADE DE ENZIMAS ASSOCIADAS À SUA DEGRADAÇÃO COMO PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DA CONFITAGEM .....          | 227        |
| POLIFENÓIS EM VEGETAIS DE USO TRADICIONAL NA COZINHA PORTUGUESA.....  | 231        |
| LOUISIAN'S RED CRAWFISH IN PORTUGAL: FROM ENVIRONMENTAL PLAGUE TO FOOD ASSET.....   | 234        |
| RELATIONSHIP BETWEEN ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF MADEIRA TABLE WINES .....   | 235        |
| STORAGE STABILITY OF A SAFER <i>OVOS MOLES</i> FORMULATION: TEXTURE AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT .....  | 239        |
| SYSTEMATIC EVALUATION OF PORTUGUESE TRADITIONAL FOODS .....   | 243        |
| VOLATILE COMPOUNDS OF "CASTELO BRANCO" DOP CHEESE .....   | 245        |
| <b>4. SEGURANÇA, TOXICOLOGIA E VALOR NUTRICIONAL .....</b>  | <b>247</b> |
| <b>4.1 SESSÃO PLENÁRIA .....</b>  | <b>249</b> |
| SEGURANÇA ALIMENTAR <i>VERSUS</i> INSEGURANÇA DO CONSUMIDOR .....   | 249        |
| <b>4.2 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS.....</b>  | <b>251</b> |
| LIPID COMPOSITION AND NUTRITIONAL VALUE OF SOME MEATS WITH PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN (PDO) .....  | 251        |
| EFEITO DO SEXO E DO PADRÃO DE CRESCIMENTO NA QUANTIDADE E NAS CARACTERÍSTICAS DO COLAGÉNIO INTRAMUSCULAR DE BOVINOS.....  | 257        |
| OCCURRENCE OF FUMONISINS B <sub>1</sub> AND B <sub>2</sub> AND OCHRATOXIN A IN <i>BROA</i> .....  | 259        |
| VALOR NUTRICIONAL DE PRODUTOS DE AQUICULTURA.....   | 264        |
| <b>4.3 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS DE PAINÉIS.....</b>   | <b>265</b> |
| GAMMA IRRADIATION EFFECT ON FATTY ACID COMPOSITION AND CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS OF LAMB MEAT .....  | 265        |
| FATTY ACID COMPOSITION, OCTADECADIENOIC CONJUGATED ISOMERS AND LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANT VITAMINS IN THREE COMMERCIAL AZOREAN CHEESES.....  | 269        |
| INFLUÊNCIA NOS TEORES DE METANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES PELAS LEVEDURAS <i>Dekkera bruxellensis</i> EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES ..... | 273        |
| COUVES CHUMBADAS.....   | 277        |
| <b>4.4 PAINÉIS .....</b>  | <b>283</b> |
| ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS PRODUZIDAS PELAS LEVEDURAS <i>Dekkera bruxellensis</i> EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES .....                 | 283        |

|   |     |
|---|-----|
| A EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DE ALGUNS ELEMENTOS VESTIGIAIS (ESSENCIAIS E TÓXICOS) NO LEITE HUMANO NO DECURSO DA LACTAÇÃO – ESTUDO DE UMA POPULAÇÃO PORTUGUESA DURANTE AS PRIMEIRAS 16 SEMANAS APÓS O PARTO..... | 287 |
| ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITES COMERCIAIS .....  | 288 |
| AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE CHÁS AÇORIANOS .....  | 289 |
| AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE DIFERENTES TIPOS DE PÃO .....  | 290 |
| AVALIAÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA DE BOLACHAS: ESTUDO DE MERCADO .....  | 291 |
| AVALIAÇÃO DOS TEORES EM HIDROXIMETILFURFURAL E ÍNDICE DIASTÁSICO EM 18 AMOSTRAS DE MÉIS PROVENIENTES DA REGIÃO DO LUSO .....  | 295 |
| AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E SENSORIAL DE VARIEDADES REGIONAIS DE POMÓIDEAS ...  | 299 |
| CARACTERIZAÇÃO DE NÍVEIS DE MERCÚRIO TOTAL E ORGÂNICO EM PEIXES DE PROFUNDIDADE CAPTURADOS NA COSTA PORTUGUESA .....  | 305 |
| CARACTERIZAÇÃO POR GC E GC/MS DAS ESPÉCIES <i>Rimicaris exoculata</i> E <i>Mirocaris fortunata</i> ..   | 308 |
| CHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORTUGUESE POPULATIONS OF <i>PHASEOLUS VULGARIS L.</i> .....   | 309 |
| COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS NA FERMENTAÇÃO DO SORGO .....   | 313 |
| COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO, CÁDMIO E CHUMBO EM ESPÉCIES DE AQUICULTURA E SELVAGENS.....  | 317 |
| COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOLIC CONTENTS IN SEVERAL DRINKS .....  | 321 |
| COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AZEITONAS DESCAROÇADAS “ALCAPARRA” PRODUZIDAS EM TRÁS-OS-MONTES .....  | 325 |
| COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE 18 AMOSTRAS DE MÉIS PROVENIENTES DA REGIÃO DO LUSO .....   | 329 |
| COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DE COGUMELOS SILVESTRES COMESTÍVEIS DO NORDESTE DE PORTUGAL.....   | 333 |
| CONJUGATED LINOLENIC ACID: A BIOACTIVE COMPONENT IN <i>FLAMENGO</i> CHEESE .....  | 337 |
| DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM VINHOS TINTOS ANTES E DEPOIS DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA .....   | 341 |
| DETERMINAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AZEITONAS POR QUECHERS E GC/MS .....   | 345 |
| DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C. COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS EXTRACTIVOS EM VÁRIAS MATRIZES DE FRUTOS.....  | 349 |
| DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS VESTIGIAIS E ULTRA-VESTIGIAIS NO VINHO VERDE POR ICP-MS .....   | 350 |
| DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLÚOR EM BEBIDAS: CHÁS E REFRIGERANTES.....   | 351 |

|  |     |
|--|-----|
| DETERMINATION OF SODIUM IN BREAD: CONTRIBUTION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY .....  | 354 |
| DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE GLUTAMATO .....   | 355 |
| EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA EM MELÃO FRESCO MINIMAMENTE PROCESSADO .....   | 359 |
| DIOXIN-LIKE FOOD CONTAMINANTS: CAN WE ELMINATE THEM FROM THE HUMAN BODY? .....   | 364 |
| EVALUATION OF OCHRATOXIN A IN URINE FROM STUDENTS IN COIMBRA, PORTUGAL: 2006 .....   | 365 |
| ESTUDOS DE ESTABILIDADE OXIDATIVA DE AZEITES VIRGENS MONO-VARIETAIS DAS CULTIVARES CORDOVIL DE SERPA, GALEGA VULGAR E VERDEAL ALENTEJANA.....                          | 370 |
| EXTRACÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS DA POLPA E DAS CASCAS DA PÊRA ROCHA E DA MAÇÃ ROYAL GALA .....   | 371 |
| FATTY ACID COMPOSITION AND RELATED NUTRITIONAL VALUE IN PORTUGUESE YOGURTS .....   | 375 |
| FITOESTROGÉNIOS NO LEITE DE VACAS COM INGESTÕES EXTREMAS DE LUZERNA.....   | 379 |
| GESTÃO DE RISCO DE DIOXINAS EM PRODUTOS AVÍCOLAS.....  | 383 |
| IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA HACCP NUMA UNIDADE DE FABRICO DE BOMBONS ARTESANAIS .....   | 388 |
| HÁBITOS ALIMENTARES E CONHECIMENTOS SOBRE ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL NUMA POPULAÇÃO ESCOLAR.....   | 389 |
| METAL COMPOSITION OF TABLE OLIVES FROM THE PORTUGUESE MARKET.....  | 394 |
| O SISTEMA HACCP NO FABRICO DE BROA DE MILHO. UM CASO PRÁTICO. ....   | 395 |
| PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SENSORIAL EM AZEITONA DE MESA DA CULTIVAR ‘AZEITEIRA’: ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO COM <i>Lactobacillus pentosus</i> .....                  | 399 |
| PERFIL MICROBIOLÓGICO DO QUEIJO DO PICO AO LONGO DA MATURAÇÃO .....  | 403 |
| PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS NA ÚLTIMA DÉCADA EM PORTUGAL – UMA REVISÃO.....  | 407 |
| PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS PELAS LEVEDURAS DO GÉNERO <i>Dekkera bruxellensis</i> EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES..... | 411 |
| RESÍDUOS DE COCCIDIOSTÁTICOS EM GÉNEROS ALIMENTÍCIOS DE ORIGEM ANIMAL.....   | 415 |
| SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SORBIC AND BENZOIC ACIDS IN YOGHURT BY CE AND HPLC: METHOD COMPARISON AND VALIDATION.....  | 419 |
| STABILITY OF CAROTENOIDS IN A MIXTURE OF ORGANIC SOLVENTS.....   | 424 |
| SUBSTÂNCIAS INDESEJÁVEIS EM FÍGADOS DE ESPÉCIES PECUÁRIAS .....  | 425 |

|  |            |
|--|------------|
| TOTAL ANTI-OXIDANT DETERMINATION IN HUMAN MILK DURING THE FIRST FOUR MONTHS OF BREAST-FEEDING.....   | 426        |
| VALIDAÇÃO INDIRECTA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B <sub>1</sub> E DE DEOXINIVALENOL POR HPLC. APLICAÇÃO A ALIMENTOS BOVINOS LEITEIROS E MILHOS                              | 427        |
| VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA POR EAA/AE PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CRÓMIO TOTAL E CRÓMIO HEXAVALENTE EM COGUMELOS.....   | 431        |
| VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS POR HPLC.....  | 434        |
| VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS: PRODUÇÃO DE COGUMELOS DO GÉNERO <i>Pleurotus</i> EM PALHA DE ARROZ E EM POLPA DE CAFÉ .....   | 435        |
| VARIAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL E PERFIL LIPIDICO DE CAPRINOS SERRANOS ECÓTIPO JARMELISTA EM FUNÇÃO DA MATURIDADE.....   | 439        |
| <b>5. RASTREABILIDADE.....</b>   | <b>443</b> |
| <b>5.1 SESSÃO PLENÁRIA .....</b>   | <b>445</b> |
| SISTEMAS DE RASTREABILIDADE NO SECTOR AGRO-ALIMENTAR.....  | 445        |
| <b>5.2 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS.....</b>   | <b>449</b> |
| EVALUATION OF THE VOLATILE COMPOSITION OF WHISKEYS BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS.....  | 449        |
| ÍNDICE CRIOSCÓPICO DO LEITE. ASPECTOS A CONSIDERAR NA ANÁLISE DO SEU SIGNIFICADO.....  | 453        |
| <b>5.3 PAINÉIS .....</b>   | <b>459</b> |
| ANÁLISE DE TRICLOROANISOL EM CONTROLO DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE ROLHAS DE CHAMPANHE .....  | 459        |
| ANALYSIS OF CONVENTIONAL AND AROMATIZED COFFEE SAMPLES BY SPME-GC-MS.....  | 460        |
| AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE ADN DE PRODUTOS DE SOJA PARA A DETECÇÃO DE OGM.....  | 461        |
| CARACTÉRISATION D'UNE FRACTION D'ALPHA-LACTALBUMINE HUMAINE ISOLÉE DES CASÉINES SUPPOSÉE ACTIVE CONTRE LA CROISSANCE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE "HUMAN COLON ADENOCARCINOMA" CACO-2. .... | 467        |
| CARACTERIZAÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE VARIEDADES REGIONAIS DE OLIVEIRA ( <i>Olea europaea</i> ) PARA AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE VARIETAL DE AZEITES DOP .....                          | 473        |
| COMPARAÇÃO DE AZEITES OBTIDOS POR PRODUÇÃO EM OLIVAL “TRADICIONAL” E OLIVAL “SUPER-INTENSIVO” .....  | 477        |
| FOSFATOS NATURAIS E ADICIONADOS EM PRODUTOS DA PESCA.....  | 482        |
| MARGARINE QUALITY MONITORING BASED ON REFLECTANCE SPECTROSCOPY.....  | 483        |
| MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA A ANÁLISE DE MACRONUTRIENTES.....   | 484        |

|  |            |
|--|------------|
| MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE PÓS-COLHEITA EM CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.) COLHIDO EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO PARA VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS..... | 485        |
| AGUARDENTE DE MEDRONHO: CONTRIBUTO PARA A RASTREABILIDADE.....   | 486        |
| OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO USADO PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILO EM VINHOS MADEIRA .....   | 487        |
| <i>TRANS</i> -RESVERATROL CONTENT IN MUSCATEL FORTIFIED WINES FROM SETÚBAL REGION .....  | 491        |
| REFERENCE MATERIALS AS A KEY ISSUE IN TRACEABILITY CHAIN OF EUROFIR FOOD COMPOSITION DATABANKS .....   | 495        |
| <b>6. PROCESSAMENTO, CONSERVAÇÃO, VIDA ÚTIL E CIRCUITOS DE DISTRIBUIÇÃO .....</b>  | <b>497</b> |
| <b>6.1 SESSÃO PLENÁRIA .....</b>   | <b>499</b> |
| NOVEL TECHNOLOGIES FOR THE THERMAL PROCESSING OF FOODS .....   | 499        |
| <b>6.2 SESSÃO DE COMUNICAÇÕES ORAIS.....</b>   | <b>507</b> |
| STUDY OF THE PUMPKIN CONVECTIVE DRYING .....   | 507        |
| INFLUENCE OF SLAUGHTER SEASON ON MAJOR LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANT VITAMINS IN CARNALENTEJANA AND MERTOLENGA PDO-BEEF AS WELL AS IN AROUQUESA AND BARROSÃ PDO-VEAL .....       | 509        |
| STUDY OF THE EFFECT OF NON-THERMAL TREATMENTS ON THE SAFETY OF SOME FRUITS AND VEGETABLES.....   | 515        |
| EFFECT OF THE THERMAL AND HIGH PRESSURE PRE-TREATMENTS AND OF HIGH PRESSURE SHIFT FREEZING ON GREEN PEPPERS FIRMNESS.....  | 521        |
| <b>6.3 PAINÉIS .....</b>   | <b>527</b> |
| AVALIAÇÃO DA DURABILIDADE DE PRODUTOS DE CHOCOLATE. ESTUDO PRELIMINAR APLICADO A BOMBONS .....   | 527        |
| ALTERNATIVE METHODS FOR SARDINE OIL RECOVERY .....   | 529        |
| AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO COMBINADOS COM A SONICAÇÃO EM CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA.....  | 533        |
| AVALIAÇÃO VITAMÍNICA E ANÁLISE DE ACEITAÇÃO DE PRODUTOS FEITOS A BASE DE BANANA VERDE.....   | 538        |
| AVALIAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA DE VARIEDADES DE TRIGO MOLE E DE TRIGO DURO .....   | 539        |
| BEHAVIOUR OF VOLATILE COMPOSITION DURING THE HEATING PROCESS OF TNM RED WINES .....  | 543        |
| BRACKETING <i>VERSUS</i> MULTI-POINT CALIBRATION: DEVELOPING ANALYTICAL PERFORMANCE FOR PLASTIC FOOD CONTACT MATERIALS .....   | 547        |

|  |     |
|--|-----|
| EDIBLE COATINGS FROM GALACTOMANNANS AND THEIR APPLICATION TO TROPICAL FRUITS .....   | 548 |
| CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA POR GC-MS E ANÁLISE SENSORIAL DE TRÊS VINHOS BRANCOS DO DOURO, DAS CASTAS <i>CERCIAL</i> , <i>RABIGATO</i> E <i>SÍRIA</i> .....   | 549 |
| COMPORTAMENTO DE TRÊS ESPÉCIES DE COGUMELOS DO GÉNERO <i>Pleurotus</i> EMBALADOS EM FILMES POLIMÉRICOS.....  | 553 |
| CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA MATURAÇÃO FENÓLICA DE UVAS DE DIFERENTES CASTAS PRODUZIDAS NA QUINTA MORGADO DA TORRE – ALGARVE .....  | 557 |
| DETERIORAÇÃO DA CARNE DE PERU EMBALADA EM AEROBIOSE E EM ATMOSFERA MODIFICADA SUA RELAÇÃO COM OS TEORES DE AZOTO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL .....  | 561 |
| DETERMINAÇÃO DA RAZÃO AMIOSE/AMILOPECTINA DE AMIDOS COMERCIAIS POR FTIR .....  | 565 |
| EFEITO DA ARMAZENAGEM EM REFRIGERADO NOS LÍPIDOS DE PEIXE GATO AFRICANO ( <i>Clarias gariepinus</i> ) .....  | 569 |
| CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE AQUICULTURA EM EMBALAGEM ACTIVA .....   | 570 |
| EFEITO DE TRATAMENTOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DE PRESSÃO E TEMPERATURA NO ABROLHAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....  | 571 |
| EFEITO DO GRAU DE TORRA NAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIIS DAS MELANOIDINAS DAS INFUSÕES DE CAFÉ .....   | 575 |
| ENVELHECIMENTO DE SUMOS DE CITRINOS EM DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGEM .....   | 579 |
| ESTUDO DO EFEITO DA ADUBAÇÃO AZOTADA, DO TIPO DE ADUBO E DA SUA ÉPOCA DE APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO E NA QUALIDADE TECNOLÓGICA DE UMA VARIEDADE DE TRIGO MOLE .....   | 583 |
| EFFECTS OF FOOD COOKING ON HETEROCYCLIC AMINE FORMATION.....   | 587 |
| EVOLUÇÃO DA COR EM VINHOS TINTOS CONSERVADOS EM CONTACTO COM APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO DE DUAS ESPÉCIES ( <i>Q. pyrenaica</i> Willd. e <i>Q. petraea</i> Liebl.): COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR VIA INSTRUMENTAL E SENSORIAL ..... | 589 |
| EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ALGUMAS CASTAS TINTAS DA REGIÃO DO DÃO DURANTE A SUA MATURAÇÃO .....   | 595 |
| ESTUDO DO EFEITO DAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS NA COR E NO SABOR DE VINHOS DO PORTO.....  | 598 |
| EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CINCO CASTAS BRANCAS DA REGIÃO DO DÃO DURANTE A SUA MATURAÇÃO .....  | 599 |
| INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE KIWI MINIMAMENTE PROCESSADO .....  | 602 |
| FABRICO DE IOGURTE COM INCORPORAÇÃO DE CONCENTRADOS LÍQUIDOS DE PROTEÍNAS DO SORO OBTIDOS POR ULTRAFILTRAÇÃO .....   | 603 |

|   |            |
|---|------------|
| FACTORES QUE INFLUENCIAM AS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE FARINHAS DE MILHO  | 609        |
| FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA – INOCULAÇÃO DE CULTURAS DE ARRANQUE .....  | 613        |
| IMPACTE AMBIENTAL CAUSADO PELO DESPERDÍCIO DE ALIMENTOS.....  | 617        |
| IMPACTO DA DESCONTAMINAÇÃO PELO CALOR NA QUALIDADE DE CENOURA<br>MINIMAMENTE PROCESSADA.....  | 621        |
| INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA NA QUALIDADE DE <i>Pleurotus<br/>ostreatus</i> .....  | 625        |
| INFLUÊNCIA DA TORRA DE AVELÃS NA SUA COMPOSIÇÃO EM VITAMINA E.....  | 629        |
| ONION DRYING: KINETIC STUDY AND CHEMICAL CHARACTERIZATION.....  | 633        |
| OPTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DE BRANQUEAMENTO EM TERMOSSONICAÇÃO NOS<br>PARÂMETROS DE QUALIDADE EM ABÓBORA ( <i>Cucurbita maxima</i> L.) ..... | 637        |
| SORPTION ISOTHERMS OF EGGPLANT ( <i>Solanum melongena</i> ) IN THE RANGE OF TEMPERATURES<br>FROM 278 TO 333 K .....                         | 641        |
| SORPTION ISOTHERMS OF MEDLAR FRUITS ( <i>Mespilus germanica</i> L.) AT 25 °C .....  | 645        |
| PRODUÇÃO DE NOVOS CORANTES NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA<br>ALIMENTAR .....   | 649        |
| <b>ÍNDICE DE AUTORES .....</b>  | <b>651</b> |



## **1. SESSÃO DE ABERTURA**

---



## A COZINHA DO ALENTEJO

*Saramago, A.*

De peito largo e franco, como a sua terra, o homem que hoje é alentejano viu, desde a aurora dos tempos, chegarem gentes de todos os horizontes e aí ficarem, com mais pressa ou mais demora, instalados com os seus usos e costumes. Atento ao novo e seguro no conhecido, o indígena destas terras a sul do Tejo, pela cultura que foi sedimentando através dos tempos, soube sempre mostrar intenção e exerceu escolha quando achou que era conveniente. A sua cozinha é um reflexo de inteligência e de sabedoria, uma união surpreendente entre culturas e é também o exemplo de que o tema da alimentação é um tema particularmente agregador e integrador porque a velha distinção entre corpo e espírito, entre matéria e intelecto, parece ter-se desvanecido face à exigência em compreender, na sua complexidade, os comportamentos alimentares do homem alentejano.

Todas as cozinhas têm um vasto legendário e uma história mítica, mas há formas menos fragmentárias, mais esclarecedoras e mais satisfatórias para o espírito para analisar as receitas dos nossos antepassados alentejanos. Em Portugal a História da Alimentação e a gastronomia têm sido tratadas com distância, desinteresse e sem qualquer cuidado e só nos últimos tempos se viram aceites pelas ciências humanas. O que se tem passado entre as fomalhas e a sala de jantar tem escapado à maioria dos historiadores, sociólogos e antropólogos. Só recentemente, arrastados pelo interesse generalizado, começaram a ocupar-se por um sector da ciência ligado ao nosso vivo quotidiano, sector que, noutros países, há muito tempo ocupa, no campo da cultura, um lugar de privilégio. Não foram dadas, em devido tempo, à história da alimentação e à gastronomia, as cartas de nobreza que há muito tempo mereciam e o resultado traduz-se na desoladora situação a que chegámos: desconhecimento dos nossos hábitos alimentares por falta de investigação sistematizada e consequente publicação de obras. Se alguma coisa existe, é muito mais consequência de entusiasmos e dedicações do que resultados de programas de estudo devidamente estruturados. Não basta proclamar, com despropositado fulgor, que a cozinha tradicional é fundamento da nossa cultura.

Terminemos com lamentos e vamos ao Alentejo, cuja cozinha tradicional tem duas características que a singularizam e que fazem que ela seja a cozinha portuguesa que apresenta maior identidade: a diversidade e a intemporalidade.

A cozinha é uma arte de circunstâncias e, no tempo presente, a cozinha tradicional é horizonte de muitas procuras e desejados encontros. A história da cozinha está ligada à história do homem porque foi essa cozinha que, em todas as épocas da história, funcionou como matriz civilizacional. Foram as circunstâncias de haver ou não alimentos que orientou o homem e a sua maneira de cozinhar e quando o homem entendeu que aquilo que comia não só o fazia viver mas que desse acto podia retirar um enorme prazer, nasceu a gastronomia. Houve povos que, durante milénios, apenas viam na comida a quotidiana necessidade de se alimentarem, enquanto outros, mais precoces na gestão dos seus sentidos, depressa entenderam que comer era um acto que ultrapassava a necessidade imperativa de sobrevivência porque também podia ser uma forma superior de contentamento. Um desses povos habitava esta parte sul da Península Ibérica que mais tarde se chamou Alentejo.

Na história do homem, todas as sociedades, grandes ou pequenas, mais simples ou mais complexas, têm a sua própria história. História tradicional que tanto pode corresponder a uma realidade como a uma mitificação. Verdadeira ou falsa, essa história funciona como um mito de origem e dá ideia de quem somos, como começámos e indica um fundamento cronológico, não só em relação ao tempo como em relação ao espaço, apontando para um princípio lógico que concretiza uma maneira particularizada de fazer as coisas.

Há sempre um «corpus» de história que dá origem às mais desconstruídas interpretações. Quando se lêem autores que viveram factos, teremos que aceitar a autenticidade da narração, mas quando passamos ao «ouvi dizer», ao domínio da franca oralidade, podemos entrar na zona do fantástico e essas fantasias, ou verdades ouvidas, continuam a linha mitológica que caracteriza um lugar ou uma região. No entanto, como dizia Henri Pirenne, a História não é só aquilo que aconteceu no passado, porque no passado aconteceram muitas coisas. A história é aquele registo do passado que faz sentido para nós, aqui e neste mesmo tempo. Teremos que aceitar o que sabemos e pôr esse saber ao serviço de um estudo e de uma boa especulação, de forma a ser possível socorrer-nos de iluminações sobre o assunto que nos interessa analisar com mais profundidade. Se estamos interessados em saber como o passado pode fazer sentido para nós, no presente, teremos que confrontar os diferentes passados míticos e considerar que esses passados são todas versões transformadas daquilo que sabemos. Com as receitas tradicionais que tentámos fixar passa-se este fenómeno.

No Alentejo, província bem marcada a sul do Tejo, a história da cozinha pode ser, de forma sumária, analisada com a perspectiva centrada em três períodos: uma época pré-romana e romana, uma época árabe e uma época que começa imediatamente depois da nossa expansão e que chega até aos nossos tempos.

Na época pré-romana vivia, nestas terras transtaganas, um povo celta — os celtici —, que tinha à sua livre disposição e vontade todos os produtos de uma natureza com acento mediterrânico. Como dizia Orlando Ribeiro, de uma forma sintética e esclarecedora, «... o Alentejo é mediterrânico por natureza e atlântico por posição...» Esse povo vivia e alimentava-se da celebrada trilogia do Mediterrâneo: trigo, azeite e vinho. Eu acrescentaria o porco, chamar-lhe-ia tetralogia alimentar, porque o porco foi, e ainda continua a ser, uma das glórias da gastronomia alentejana.

Grandes florestas de azinheiras e de sobreiros alimentavam um animal pouco menos que selvagem, que errava à procura de ervas e de bolota, quase em regime livre, ou sob o controle teórico de um porqueiro, apenas um pouco mais civilizado que o animal que guardava e que, talvez por essa razão, ocupava o último lugar na hierarquia social dos servidores rurais.

Assim que as hordas de caçadores-recolectores começaram a fixar-se ocupando-se principalmente das culturas nascentes, os porcos vieram das florestas à procura de alguns grãos e restos de alimentos das populações já sedentarizadas, deixando-se domesticar com facilidade e proporcionando, dessa forma, uma abundante e saborosa quantidade de carne.

As datações e as análises feitas, em diferentes estações arqueológicas, a restos de comida e a diferente utensilagem, permitem concluir que as gentes dessa época sabiam preparar carnes e peixes e que conheciam a técnica de transformação dos grãos de cereais em farinha. O mel, que nas Serras de Ossa, de Portel e Serpa era abundante e o leite de cabra e ovelha, com o qual fabricavam queijos, completavam, com o recurso intensivo à caça, a dieta alimentar desses nossos antepassados. Tudo amparado pelas duas gorduras assistenciais que se mantiveram até hoje: a banha de porco e o azeite.

O Alentejo, onde existe a maior concentração de necrópoles dolménicas, o que evidencia a existência de uma pujante civilização megalítica, tem comido, através dos séculos, os mesmos produtos que os engenhosos construtores de antas, alguns confeccionados ainda da mesma forma. Dos restos encontrados em alguns dólmenes e analisados com a ajuda das novas tecnologias de datações, conclui-se que o queijo, por exemplo, era fabricado da mesma maneira e com o mesmo coalho — o cardo —, que hoje se utiliza. O porco era comido preferencialmente assado nas brasas, com sal e com alho, ou com a ajuda de uma raiz da mesma família. Espinhas de peixe, do rio e do mar, elucidam sobre um trânsito entre o litoral e o interior. A presença de vários bivalves, amêijoas e outros parentes próximos, pode deixar estupefactos aqueles que se atormentam em encontrar razões para a receita de carne de porco

com amêijoas. E o pão, feito de trigo, com uma farinha grosseiramente peneirada, cheia de farelo, não diferia muito do pão de trigo chamado "escuro" ou de "segunda", que ainda há poucos anos era consumido em todas as terras do Alentejo. Foi numa anta do concelho de Reguengos de Monsaraz que se recolheram restos de comida juntamente com restos de menta pulegium, mais prosaicamente, poejos, velha erva companheira de açordas e outros cozinhados que nos assiste há mais de três milénios.

Antes dos romanos muita gente teve a amabilidade de nos visitar e, fenícios, gregos e púnicos por aqui entraram sem grandes contrariedades. O Alentejo foi sempre campo aberto e largo para a entrada de novas gentes e esses povos trouxeram consigo alguns produtos que enriqueceram a escolha dos alimentos disponíveis. Algumas espécies vegetais, principalmente ervas aromáticas como a segurelha e a sálvia, trazidas pelos gregos, entraram de imediato nos hábitos alimentares de um povo que muito cedo aprendeu a retirar das plantas selvagens, espontâneas, os aromas e perfumes para melhorarem o sabor das confecções alimentares.

Quando os romanos chegaram a esta terra de bárbaros, trouxeram com eles os luxos da sua civilização e, ao contrário do carácter isolado, conservador e arcaizante do Norte, tomaram contacto com um Sul mais aberto às grandes descobertas da civilização. Trouxeram estradas largas e firmes, pontes sólidas e seguras, telhas para substituir o colmo dos tectos das casas, ladrilhos para as pavimentar e, além disto, uma nova língua e novas regras para a agricultura. Ensaíaram-se sementes melhoradas de trigo com possibilidades de aumentarem as produções, assim como se começaram a utilizar alfaias mais desenvolvidas, capazes de trabalharem melhor e mais terra em menos tempo. Engenhos de vento e de água foram instalados para com mais facilidade moerem os grãos dos cereais. Mós mais aperfeiçoadas para triturarem a azeitona que assim produzia mais azeite. Construíram-se picotas e condutas de água para irrigarem o terreno com mais facilidade, dando-lhe aptidões para um leque alargado de culturas que pudessem crescer de forma mais ordenada. Era necessário dar de comer a legiões numerosas de gente que aqui se estabeleceram e o desenvolvimento era imperativo. Os romanos trouxeram também uma nova técnica para trabalhar o barro e o vidro, revolucionando os utensílios para cozinhar e conservar alimentos. Com eles viajaram os usos e costumes característicos da sua dieta alimentar que influenciaram as formas de comer das gentes desta parte da Ibéria, recebendo, em troca, ensinamentos de práticas da cozinha indígena, que modificaram alguns dos seus hábitos de confecção porque, como dizia Estrabão, este sul do Tejo era o «paraíso das ervas frescas».

Os romanos, furiosos por peixe, completamente ictofágicos, enraizaram o costume do seu consumo na alimentação desta terra alentejana. São bizarras algumas histórias sobre o mercado de peixe em Roma, onde algumas variedades atingiam preços inenarráveis. Também eram célebres os aquários particulares de grandes senhores, que se permitiam gastar fortunas para encaminhar as águas do mar para os seus viveiros particulares onde, por exemplo, havia douradas alimentadas dia e noite por escravos que lhes lançavam ostras.

É um erro comum e ainda hoje muito instalado, pensar que o Alentejo nunca passou, em termos de dieta de peixe, de umas sardinhas salgadas, peixe seco, algum bacalhau e o omnipresente cação. Ainda no tempo pré-cristão era hábito deixar de consumir carne durante algum tempo, porque a carne era considerada «quente», forte, de muito sangue e gordura, características que conduziam, com facilidade, à excitação e à euforia. Durante esse tempo o consumo de peixe aumentava porque ele constituía a base da alimentação desses períodos de austeridade. Já na era cristã, o tempo de quaresma e outras festas de carácter litúrgico, somavam 166 dias de abstinência, quer dizer, quase meio ano sem comer carne. O peixe, pela sua associação com a água, é frio, branco, magro e triste e, por todas estas razões, bom para a pausa da carne. Sob o ponto de vista moral a abstinência era uma forma das pessoas se redimirem das suas faltas através de um sacrifício, permitindo pôr em evidência que, perante

Deus, todos somos iguais. A Igreja adoptou com todo o entusiasmo a prática do jejum e da abstinência valorizando o consumo de peixe. A sagrada Instituição considerava-o como uma forte simbologia de regeneração e, com o seu consumo imposto e generalizado, cumpria socialmente um dever, uniformizando a alimentação entre pobres e ricos. Na realidade, não era assim que acontecia, conhecem-se descrições detalhadas de largos e principescos banquetes magros de peixes, alguns no Alentejo, como dão notícia documentos dos cartórios dos conventos da Cartuxa, em Évora e da Conceição, em Beja.

O peixe estava presente, e de forma expressiva, na dieta alimentar da terra que hoje é Alentejo. Com uma costa larga de mar, com Setúbal e Alcácer do Sal a pouco mais de um dia de jornada de qualquer terra no Alentejo, não é difícil imaginar que os transportes se fizessem com regularidade, levando produtos locais para os portos de mar e de lá trazendo peixe fresco, peixe salgado e sal. E se o interior do Baixo Alentejo nos parece longe da costa, lembremos da navegabilidade do Guadiana até Mértola, porto onde chegavam regularmente barcos carregados de diferentes produtos, entre eles, peixe fresco.

Foram também os romanos que trouxeram as melhorias de técnica da salga e os seus salinadores estabeleceram-se em Setúbal e Alcácer do Sal, onde construíram enormes salinas e fundaram as primeiras fábricas de garum, condimento feito de ovas, e interiores de peixe e sal, que servia para temperar a maioria das confecções da época. Começou-se a salgar melhor, não só pelo melhor sal que se obtinha, como também pela técnica de olaria que permitia a construção de ânforas e salgadeiras que guardavam peixe e carne durante mais tempo e em melhores condições.

Os novos invasores, que conquistaram mais por aculturação de costumes do que através de sangrentas batalhas, introduziram, também, a arte de criação de galinhas e galos, com novas raças, com melhor sabor e mais quantidade de ovos postos. O galo era considerado pelos romanos um animal carregado de forte simbologia erótica e, «matar um galo», no Alentejo, foi durante muito tempo um acto com uma grande ritualização de festa. Matava-se um galo quando o namorado ia pela primeira vez a casa da noiva, quando era dia de anos, de casamento ou de baptismo, etc. Ainda hoje se confecciona como dantes era cozinhado: dava-se uma cozedura, para fazer uma canja, e depois corava-se no forno, devidamente barrado com um piso de alho, coentros e sal. Outra ave introduzida na época foi o ganso, em relação ao qual os romanos tinham receitas de grande refinamento e uma delas, a do ganso lacado com mel com a sua canja acompanhada com fatias de pão torrado barrado com o fígado do próprio ganso, ainda se executa no Alentejo.

O porco alentejano alimentado a bolota deixou os romanos surpreendidos, porque este animal era um dos mais estimados na sua dieta. Tinham várias receitas para confeccionar o porco mas, tanto Columelle, como Plínio, referem os porcos desta terra como os melhores e dizem que o leitão recheado de ervas, prato considerado como um dos mais conceituados, era uma das receitas famosas do Império. Para se entender melhor a consideração em que era tido o leitão de bolota alentejano, refira-se o seu preço: quinze vezes superior ao preço de uma galinha e vinte vezes o preço de um litro de vinho.

Também o tempo romano foi tempo de melhoria da salsicharia e os enchidos alargaram as suas variedades, principalmente as morcelas, porque eram feitas com sangue, alimento que se entendia como orgiástico e propiciador dos jogos de amor. O fígado de porco era especialmente apreciado, grelhado, tal como ainda hoje se faz em dia de matança. A língua e a cabeça de porco instalaram-se nos hábitos alimentares das classes populares e o presunto, salgado e apenas ligeiramente fumado, começou a ser untado com azeite, antes e depois da cura. A cabeça de porco inteira, depois de cozinhada e enfeitada, era habitualmente centro de mesas e diz Plínio que lhe metiam bolotas na boca para celebrarem o produto que fazia do porco uma carne de excelência rara.

Nos códigos de leis romanos havia regras para a matança do porco, os machos eram mortos a partir de Novembro e as fêmeas no mês de Dezembro. O porco era o animal mais estimado e em todas as casas engordava-se pelo menos um porco, como tem acontecido até ao Alentejo dos nossos dias. A matança era um dia de festa, com fortes celebrações, reunindo toda a família e amigos, que ajudavam tanto no trabalho como nas refeições, altura em que o porco começava de imediato a ser consumido. Como acontece ainda hoje. A importância do porco foi de tal forma significativa na sociedade romana que não raras vezes erigiram monumentos em sua honra. Um dos mais importantes, ligado ao culto de Endovélico, situa-se num cabeço, junto a Terena.

Não só o porco como outros produtos que fizeram parte da dieta alimentar dos romanos continuam a ser parte constitutiva da dieta actual alentejana. Como exemplo, cite-se uma cena recta, um jantar realizado em Évora e comentada por Columelle: Gustatio, que eram as entradas: tordos fritos, espargos, galinha corada, papafigos fritos, filetes de porco e pasta de aves gordas. Sopa: de alho e ervas com pão. Peixe: congro assado. Cena: lombo de porco, patos assados, lebres assadas e assados de aves. Finale: creme de farinha e ovos e biscoitos. Dois milénios passados podemos comer, se o estômago o permitir, um jantar com os mesmos produtos e as mesmas confecções.

Com a chegada dos árabes verificaram-se algumas alterações nos costumes alimentares. Embora a condescendência para com os cristãos tivesse sido efectiva e de grande nobreza de espírito, a religião muçulmana, que considerava o porco como uma das carnes interditas, animal impuro e símbolo de luxúria, obrigou a uma restrição no seu consumo. Digo restrição porque o espírito aberto e inteligente dos muçulmanos não chegou a decidir a proibição absoluta. Só existiu nos lugares públicos de venda e só foi objecto de sanções quando o seu consumo era descarado e ostensivamente ofensivo dos preceitos religiosos do ocupante. Não há notícia de abates generalizados de porcos ou de erradicações gerais. Continuou a haver matança em casa dos cristãos e o seu consumo, embora diminuído, continuou.

Esta nova gente que agora ocupava as terras que antes tinham pertencido ao Império Romano, trouxe ensinamentos para melhorar os processos agrícolas, novos conceitos de criação de gado e, também, ciência e artes, como a poesia, o canto e uma nova arquitectura. Com eles também se iniciou uma nova forma mais sofisticada de estar à mesa e de comer.

É pena que, por razões de fanatismo religioso, a civilização árabe na Península Ibérica, principalmente aqui em Portugal, não tenha a divulgação e o estudo que merece. Estigmatizados como infiéis, como gente inferior que era necessário matar, a sua brilhante cultura foi ocultada, subtraindo ao nosso conhecimento os esplendores dessa civilização.

Os franceses arrogam-se a importância de terem tido o primeiro livro de cozinha, mas esquecem que no século VII, setecentos anos do seu Taillevent, já Ibn Razin tinha publicado o seu *Fadâla al Jiwân*, com centenas de receitas, devidamente narradas, com tempos exactos de confecção, com indicação das vasilhas a utilizar, os cuidados a ter com o lume, de lenha ou de carvão, conforme as receitas, a maneira de servir, etc. Conhecido é também o *Kitâb-al-tabîj*, de autor anónimo, com quinhentas receitas, contemplando tudo o que se comia nos séculos X e XI.

As grandes ajudas que a cozinha árabe trouxe à cozinha dos cristãos incidiram, principalmente, nas verduras e frutas, e a sua produção criou o conceito de horta, com a sua específica agricultura.

É longa a lista que trouxeram e que fixaram em receitas: espinafres, alfaces, chicória, couves, rábanos, cenouras, nabos, etc. As árvores de fruto que chegaram foram a figueira, amendoeira, limoeiro, nespereira, nogueira, uma variedade de laranja azeda, pessegueiros, etc. Além dos grãos, melancia, melão, abóbora e outras variedades em pleno consumo. Importante, também, foi a introdução, sistemática, na dieta alimentar, da carne de borrego.

Uma outra modificação importante com a fixação dos muçulmanos foi a diminuição do consumo de peixe. Sem a obrigação quaresmal do jejum, a carne, que era sempre mais apetecida e mais próxima, ocupou lugar de maior importância, embora as receitas dos livros de cozinha árabes informem sobre as diferentes variedades de peixes e a forma superior de os confeccionar. Há receitas de pescadas, congros, salmonetes, angulas, etc.

As receitas de carne, aves, caça e, principalmente, as de borrego, que nas receitas de carne ocupam quase metade da totalidade, são descritas minuciosamente e descrevem todas as fases de confecção. Um interessante aspecto destes receituários são as indicações precisas e cautelosas sobre os utensílios a empregar: ânfora grande ou pequena, assadeira grande ou média, caçarolas perfuradas ou não, tachos com testos ou com câmpanulas, utensílios que os oleiros alentejanos levaram uma vida a moldar e a cozer. Utilizavam também o vidro, o estanho, o cobre ou o ferro e, mais uma vez aí estão, alguns ainda em plena actividade, os artífices destas matérias onde a cozinha alentejana tem sido executada através dos tempos.

As indicações para a utilização de cada peça eram detalhadas e havia o cuidado de prevenir contra a ferrugem se a peça recomendada fosse de ferro, ou para o verdete, se fosse de cobre. As indicações sobre limpeza também não eram escassas e, num tratado, pode ler-se que depois da utilização, as vasilhas deviam ser limpas com lavagens diárias com uma mistura feita de barro, sabão e flores secas. A celebrada limpeza alentejana pode encontrar aqui uma das suas raízes.

No livro *Kitâb-al-tabîj*, traduzido e comentado por Huici de Miranda, vem mencionada uma receita de açorda. Também Ibn Abd al-Ra'uf, noutro tratado de alimentação, fala da açorda, *tarîd*, ou *tarida* em árabe, dizendo que se prepara com bocados de pão migados, alho, coentros e água bem quente.

*Tarîd* vem de *tarada*, raiz que significa «migar pão», e com a *tarîd* comiam-se muitas coisas.

A açorda, que veio de um tempo pré-romano, atravessou o Império, o tempo árabe e chegou até nós com a mesma pujança e os mesmos ingredientes. Também o borrego merece uma atenção particular em vários tratados de receitas árabes, principalmente em relação a duas receitas: borrego assado e o ensopado.

O borrego assado é posto de molho na véspera, escolhidas as melhores partes, pernas e mãos, numa mistura de vinagre, alho, cebola, um pouco de azeite, sal, sumo de um limão verde e um pouco de açafreão. No dia seguinte, numa assadeira grande de barro, verte-se metade do caldo onde esteve o borrego a marinar, e depois deitam-se as carnes e leva-se a assar em lume de chão que não esteja muito forte. Quando o tempo de assar estiver a meio, e aqui o autor diz que cada um deve conhecer o seu fogo como o seu filho, voltam-se todas as peças de carne, regam-se com a outra metade do líquido da marinada e fica outra vez no lume. A carne, diz o tratadista, deve ficar dourada por fora e muito tenra por dentro. Quem é que não sabe que o melhor borrego assado que se faz no Alentejo é aquele que é feito em barro, com estes mesmos temperos, em lume de chão?

A outra receita, a de ensopado, nem sequer vale a pena narrá-la porque é igual a todos os ensopados, os que não levam batata, que se fazem em terras alentejanas. A receita que vem mencionada no *Kitâb-al-tabîj* é exactamente igual à receita de ensopado que ainda hoje se faz em muitas terras do Baixo Alentejo e que tem o nome de «ensopado à pastor».

Estes são dois exemplos para referir a intemporalidade da cozinha alentejana. São ainda de matriz árabe a maioria dos doces e bolos populares do Alentejo, onde as ervas doces, as amêndoas, os pinhões e a canela, entram em confecções que são feitas como se faziam há dez séculos.

Da chamada «Reconquista» até à Expansão, o Alentejo viveu com um pé aqui e outro no al-Andalus, porque as relações comerciais não cessaram e a circulação de produtos fazia-se da mesma forma como se fazia antes da saída dos muçulmanos.



Essa circulação de bens alimentares fez que a dieta alimentar do Alentejo não se modificasse até aparecerem os primeiros produtos trazidos com a Expansão, produtos que vieram introduzir novas modificações à cozinha transtagana.

Os mais importantes e que ocasionaram mudanças com alguma força no receituário alentejano, foram o tomate, o pimentão e, mais tarde, a batata e o arroz. Os produtos nobres da Expansão, as especiarias, tiveram uma entrada muito discreta na cozinha alentejana que utilizava, há muito, ervas aromáticas, dispensando os grandes exageros das pimentas, gengibre e outros exotismos da moda.

O tomate assentou nas hortas e daí passou para a cozinha em diversas execuções culinárias, constituindo só por si um prato em que era ingrediente principal, ou servindo de complemento a outras receitas que melhoraram com a sua adopção. O pimento teve uma importância maior pela ajuda que veio dar aos enchidos, não só pelas suas qualidades de óptimo tempero, mas também porque, com ele, se começou a conservar melhor e durante mais tempo a carne cheia e fumada e sabemos como os enchidos de porco têm sido importantes na dieta alimentar do Alentejo. A batata, aparecida mais tarde, assim como o arroz, vieram complementar o receituário alentejano e com estes dois alimentos ficou fixada, até hoje, o que poderemos chamar a cozinha tradicional alentejana. Cozinha que apesar da sua intemporalidade tem sabido ser dinâmica, ajustando-se às circunstâncias, às maneiras e aos modos. Aberta a aceitar o que esteja de acordo com a sua identidade, é uma atitude de sabedoria a forma como essa cozinha tem sabido reagir a heresias que a pretendem modificar, sem fortes razões e sem fundamentos, mas que sabe analisar as inovações que a podem enriquecer sem risco de a fazerem perder os traços identitários.

Exemplos de influências aceites sem reservas são as práticas culinárias da região de Barrancos, que reflectem a influência espanhola na sua dieta quotidiana, assim como o receituário tradicional da Azaruja que evidencia, ainda hoje, os usos e costumes dos homens da Catalunha que aí se fixaram no trabalho da cortiça desde o século passado.

Embora exista uma cozinha tradicional do Alentejo, há várias cozinhas nesse mesmo Alentejo, consequência não só de influências externas como de hábitos e costumes instalados há vários séculos. É preciso deixar claro que uma receita não tem necessariamente uma única matriz, que não existe, salvo raras excepções, um arquétipo de receita que tivesse dado origem, posteriormente, a outras receitas, com introdução de modificações de ingredientes ou de confecção.

Não há uma receita verdadeira e todas as outras falsas, o que há é uma cozinha que cada um de nós traz na cabeça e que é a cozinha da nossa infância e da nossa adolescência. Se crescemos com uma açorda feita só com poejos, dificilmente entendemos que ela se possa fazer com coentros. Não devemos rejeitar, por ignorância, uma receita só pelo facto de ela não ser do nosso conhecimento. O tempo em que as maneiras de cozinhar foram tomando forma, é um tempo infinitamente maior do que o tempo da nossa memória e não podemos socorrermos, apenas, dessa memória para estabelecer juízos definitivos sobre um determinado uso ou costume. Através dos tempos tem havido modificações, umas circunstanciais como, por exemplo, a abundância ou a escassez de produtos, que obrigam a uma modificação na execução culinária, outras determinadas por imaginações que pretendem improvisar sobre um tema, outras ainda adequando-se a paladares que preferem umas coisas em detrimento de outras.

Quantas vezes, na mesma família, com a mesma educação de paladares, as receitas divergem a partir da vontade expressa de alguém que entendeu que melhor seria confeccionar de uma outra forma. Todas as receitas têm direito à razoabilidade de aceitação desde que, sendo receitas de uma determinada região, respeitem a inclusão de produtos dessa mesma região e que não se afastem, de forma desordenada, das suas habituais confecções. Porque cozinha

regional, ou tradicional de uma determinada região, caracteriza-se por isso mesmo, é um corpus de receitas feitas com produtos originários dessa mesma região, confeccionados segundo uma determinada forma que, embora não seja rigorosa porque admite algumas interpretações, não aceita heresias.

Há muito que está estabelecido, sem se saber muito bem porquê, que a cozinha do Alentejo, além do ensopado de borrego e da carne de porco, não passa de pão com ervas aromáticas. A ignorância, infelizmente, instala-se e é muito difícil retirar-lhe crédito. A cozinha do Alentejo é rica, mas é rica não só de imaginação, é rica de produtos e de maneiras de confecção. As receitas que aqui se narram e que foram escolhidas de um vasto acervo, incluem algumas receitas populares, mas também algumas receitas pertencentes a uma cozinha de corte, que são igualmente desconhecidas por grande parte dos leitores. Essas receitas de corte, são receitas alentejanas, feitas com produtos alentejanos e executadas e imaginadas por alentejanos. Lembrar-se-ão as pessoas, principalmente aquelas que da cozinha do Alentejo têm uma ideia avulsa e confusa que, a seguir a Lisboa, foi no Alentejo que a Corte permaneceu mais tempo? Que o Paço de Évora era residência habitual de D. João II, de D. Manuel, de D. João III? Que em Vila Viçosa os reis viveram e se demoraram em longas permanências?

Nesses Paços, as cozinheiras eram quase sempre alentejanas, como se pode constatar através de várias crónicas da época e o hábito de as utilizar permaneceu até ao tempo de D. Carlos que, quando estava em Vila Viçosa, dizia que pretendia comer como um lavrador alentejano. As receitas de corte passavam para o lado de fora do palácio, através da aristocracia local que frequentava o Rei, através dos criados que os serviam, através de gente de cozinha que preparava as receitas. Da mesma forma, como vários documentos evidenciam, a cozinha popular instalava-se nas cozinhas reais e dessa interacção nasceu uma cozinha rica, variada, com acento popular que foi adoptada com facilidade. Esta breve viagem pela história da cozinha alentejana através dos tempos tem a intenção de ajudar a entender as receitas que se conhecem, situando-as no tempo, fixando-as como consequência de uma matriz feita através do cruzamento de culturas diversas, culturas que foram aproveitadas por um povo atento, carregado de intenções e decidido nas escolhas.

A cozinha alentejana tem cada vez mais força e tem resistido a atentados e contrariedades. Está na moda, mas terá que ser muito bem defendida para poder continuar a ser o que é, esplendorosa, sem vertigens de identidade, generosa e pujante.

## **2. ALIMENTOS FUNCIONAIS**

---

### **2.1 Sessão Plenária**

**Los Alimentos funcionales en el mundo de hoy**

### **2.2 Sessão de Comunicações Orais**

### **2.3 Sessão de Comunicações Orais de Painéis**

### **2.4 Painéis**



## LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN EL MUNDO DE HOY

*Mataix, J.*  
U. Granada

El mundo del alimento funcional en los momentos actuales es sin duda una realidad alimentaria, pero no por eso deja de estar lleno de ambigüedades, imprecisiones y contradicciones.

Para la mayor parte de los especialistas “es un alimento procesado que tiene como objetivo contribuir a la salud”. Esto ya implica ambigüedad, pues para algunos autores, la condición de procesado no es siempre necesaria, de tal modo que el brócoli o la soja pueden considerarse alimentos funcionales. Por otra parte, según la anterior definición, su contribución a la salud parece que es novedosa, hasta el punto que un alimento corriente, como puede ser el pan, no tuviera esa misma capacidad de proporcionar salud. Desde la perspectiva del que esto suscribe, una visión tan simple y tan poco precisa no es aceptable y responde a un momento muy coyuntural, en que alguna investigación también muy aislada, apoya algún efecto beneficioso, a veces de dudosa significación.

El sentido más exacto de un alimento funcional sería el de que a través de una composición en nutrientes (y de otros componentes alimentarios de interés actual de cara a la salud), que se ha conseguido tecnológicamente, se evitan errores nutricionales que afectan la salud, o se refuerzan determinados efectos beneficiosos que permiten una más segura consecución de la misma.

Así, por ejemplo, en los países socio-económicamente desarrollados, la existencia de alimentos funcionales, está al servicio de la prevención de enfermedades que mayor prevalencia presentan en esos países, como cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, etc.

Para mostrar claramente esta intencionalidad, en el caso concreto de la Unión Europea, el diseño de alimentos funcionales se recomienda que vaya dirigido a intervenir sobre una gran diversidad de funciones objetivo que se encuentran agrupadas en seis grandes áreas:

- Crecimiento, desarrollo y diferenciación.
- Metabolismo de sustratos.
- Defensa frente a especies reactivas de oxígeno.
- Sistema cardiovascular.
- Fisiología Intestinal.
- Funciones de conducta y psicológicas.

Obviamente, en el caso de países subdesarrollados o socio-económicamente débiles, el objetivo de un alimento funcional es diametralmente opuesto. En estos casos, la salud a través de la alimentación no viene por excesos y desequilibrios dentro de ese exceso, sino de una dieta pobre que además se compone de muy pocos alimentos, en que a veces, uno sólo de ellos, constituye la parte más importante de la dieta. En estos casos, un hipotético alimento funcional debía paliar las posibles deficiencias nutricionales, que su mala alimentación comporta.

Dentro del término alimento funcional se encuentran alimentos muy diversos, que de una manera bastante general se podrían encuadrar en tres grandes grupos. En el primero estarían aquellos alimentos de los que tecnológicamente se han eliminado determinados nutrientes u otros componentes alimentarios. Dentro de este grupo destacan aquellos a los que se les ha eliminado la grasa, para reducir su valor calórico (leche, quesos, embutidos, etc.) y que coloquialmente conocemos como “light” o “ligeros”, o alimentos en que se ha sustituido su grasa natural por una de tipo más cardiosaludable (por ejemplo, la leche a la que se reduce la grasa saturada y se sustituye por insaturada).

En un segundo grupo se incluirían alimentos enriquecidos en determinados nutrientes u otros componentes alimentarios de interés saludable, como son vitaminas, minerales, fibra, aminoácidos, compuestos fenólicos, isoflavonas, etc. Es el caso de cereales de desayunos enriquecidos en algunos de los nutrientes citados, o de leches enriquecidas con calcio, o con ácidos grasos omega-3, o con aceite de oliva, o pan enriquecido con ácido fólico, o incluso zumos a los que se ha adicionado calcio.

Dentro de este grupo se podrían incluir los alimentos transgénicos, cuya modificación genética conduce a un aumento (o disminución) de algún o algunos nutrientes. Por ejemplo, arroz rico en vitamina A y hierro.

Por último, existiría un grupo con características muy definidas que es el de probióticos y prebióticos. Los primeros suministran gérmenes beneficiosos para el ser humano, que alcanzan el intestino grueso donde ejercen los citados efectos y en cuanto a los prebióticos, son alimentos que contienen componentes que facilitan que los gérmenes antes indicados, puedan proliferar, persistiendo y manteniendo efectos saludables.

Un aspecto interesante de los alimentos funcionales es que, además de incorporar nutrientes (o en algún caso eliminarlos), están prestando especial atención a otros componentes alimentarios, que no siendo considerados como nutrientes dentro de la ortodoxia más estricta, parecen tener o tienen capacidad de mejorar la salud. Entre ellos pueden citar bastantes ejemplos, que suelen encontrarse mayoritariamente en algunos alimentos en concreto: beta-glucanos (avena), isoflavonas (soja), lignano (semillas de lino), licopeno (tomate), aliína (ajo), compuestos fenólicos (aceite de oliva, vino, té), ácido linoleico conjugado (ternera), fructooligosacáridos (espárragos, remolacha), galactooligosacáridos (leche), etc.

Un aspecto relevante es del papel del alimento funcional en el conjunto de la alimentación habitual. En este sentido, nunca puede constituir la base de la misma, que debe seguir llevándose a cabo con los alimentos de siempre. Podrá estar como un elemento más, en la mayoría de ocasiones de modo puntual, y siempre que exista o se sospeche riesgo de deficiencias o desequilibrios nutricionales, o se desee potenciar alguna función fisiológica que conduzca a un mayor estado de salud.

Posiblemente el gran problema que actualmente, y puede que más en el futuro, planteen los alimentos funcionales, sea o no sólo su correcto uso, sino poder diferenciar los que responden a un criterio real de la mejora de salud, de aquellos otros que buscan sólo una manera de hacer estrategia de marketing, y esto desgraciadamente ya se está viendo en la actualidad.

# BOLACHAS FUNCIONAIS RICAS EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS $\omega$ 3, POR INCORPORAÇÃO DE BIOMASSA DE *Isochrysis galbana*

Coutinho<sup>1</sup>, C.; Mendonça<sup>1</sup>, E.; Batista<sup>2</sup>, A.P.; Bandarra<sup>3</sup>, N.; Raymundo<sup>2</sup>, A.; Gouveia<sup>4\*</sup>, L.

<sup>1</sup> Extensão da Escola Superior de Biotecnologia em Caldas da Rainha, Universidade Católica Portuguesa, 2500-237 Caldas da Rainha, Portugal. <sup>2</sup> Centro de Investigação de Engenharia Alimentar e Biotecnologia. Instituto Piaget - ISEIT de Almada. Quinta da Arreinel de Cima, 2800-305 Almada, Portugal. <sup>3</sup> Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar - IPIMAR. Av. Brasília, 1449-006, Lisboa, Portugal. <sup>4</sup> Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação - DER-INETI - Unidade Biomassa, Estrada do Paço do Lumiar, 1649-038 Lisboa, Portugal. Tel.: 21 712 72 10. Fax.: 21 712 71 95  
([luisa.gouveia@ineti.pt](mailto:luisa.gouveia@ineti.pt)).

**Palavras-chave:** *Isochrysis galbana*; cor; textura; PUFA's; bolachas funcionais.

**Resumo:** A indústria alimentar moderna aponta para a criação de alimentos cada vez mais baratos, versáteis e que apresentem benefícios para a saúde humana. O uso de ingredientes com propriedades funcionais consiste num meio atractivo para a obtenção de novos produtos, com um importante impacto de mercado. Neste contexto, o uso de biomassa microalgal de *Isochrysis galbana*, como ingrediente funcional, para a obtenção de bolachas funcionais ricas em ácidos gordos polinsaturados  $\omega$ 3 (PUFA's), em especial ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega$ 3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 $\omega$ 3), constituiu a base de estudo. A estabilidade da cor foi avaliada, através da evolução dos parâmetros L\*a\*b\* (sistema CIELAB) ao longo de três meses, verificando-se grande estabilidade após a primeira semana. Os diversos níveis de incorporação de microalga (0%; 1% e 3%), resultaram em bolachas com diferentes colorações (do amarelo ao verde escuro). A análise de textura revelou um aumento linear e significativo da firmeza, com o aumento da concentração de biomassa da microalga incorporada. A presença de PUFA's (em especial EPA) nas bolachas com adição de *I. galbana*, foi quantificada, tendo-se obtido níveis de PUFA's de 100 mg/100g e 320 mg/100g de bolacha (para 1% e 3% de incorporação de *I. galbana*, respectivamente).

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma preocupação crescente, no sentido de criar hábitos e estilos de vida cada vez mais saudáveis. Assim, tem-se verificado um crescimento do mercado dos alimentos funcionais que, para além de satisfazerem as necessidades nutritivas básicas, têm um efeito benéfico para a saúde [1]. Destes, fazem parte por ex. os ácidos gordos polinsaturados (PUFA's), vitais para o desenvolvimento cerebral, formação da retina e das membranas biológicas [2, 3], bem como na profilaxia e terapia de doenças crónicas e degenerativas (redução do colesterol do sangue [4], protecção contra doenças cardiovasculares e coronárias, arterosclerose, diabetes, hipertensão, doenças metabólicas e digestivas, bem como cancro) [5-7]. Estes compostos são geralmente fornecidos por peixes e óleos de peixe. Contudo o "stock" global de peixe encontra-se em declínio, facto derivado da pesca excessiva e da destruição massiva dos pesqueiros. Os óleos derivados de peixe encontram-se também contaminados por inúmeros poluentes, metais pesados e toxinas. As microalgas são fontes alternativas de PUFA's, particularmente atractivas.

A microalga *Isochrysis galbana* é uma fonte rica em PUFA's, principalmente ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega$ 3) [8], bem como esteróis [9], tocoferóis [10] e pigmentos [11].

As bolachas são um produto alimentar mundialmente consumido, sendo apreciadas pelo seu sabor, versatilidade, conveniência, conservação, textura e aspecto apelativo.

O objectivo do presente trabalho consistiu na obtenção de bolachas funcionais (ricas em PUFA's), por incorporação de biomassa de *I. galbana* numa receita de bolachas de manteiga tradicionais. Foram avaliados ao longo de 12 semanas, os parâmetros de cor (CIELab system) e textura, em função da concentração de microalga usada. Foi ainda avaliado o perfil de ácidos gordos ao longo do tempo, em função da concentração de microalga.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Produção de Microalga**

A microalga usada neste estudo foi a *Isochrysis galbana* proveniente da colecção do “Mary Park” e mantida no IPIMAR desde 1973. A *I. galbana* foi crescida em meio apropriado (água do mar enriquecida com meio “Miquel's” e meio “Wallerstein's”), num sistema *batch*, em mangas de polietileno de 100 L com agitação por borbulhamento de ar, a 25 °C e iluminação contínua [7]. A recolha da biomassa microalgal na fase estacionária de crescimento, foi efectuada por simples paragem de agitação, concentração por centrifugação contínua e liofilização.

### **2.2. Preparação das Bolachas**

As bolachas foram preparadas usando 23% açúcar, 20% manteiga, 46,5% farinha, 10% água e 0,5% de fermento em pó [12]. Prepararam-se bolachas com 1% e 3% de (p/p) de microalga e bolachas controlo sem adição de biomassa microalgal. A incorporação de *I. galbana* foi efectuada por mistura na farinha, de modo a perfazer a quantidade relativa da mesma. Os ingredientes foram pesados e misturados num recipiente. Após homogeneização a massa foi moldada e cortada em pequenas bolachas redondas com uma espessura de 8 mm, que foram cozidas num forno (Freibol, Modelo FB) à temperatura de 180 °C durante 30 min. No final, após cozedura, deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente e acondicionaram-se em sacos de plástico, que se colocaram em frascos ao abrigo da luz.

### **2.3. Análise da Cor**

A cor das bolachas foi avaliada com um colorímetro CR300 da Minolta (Japão), usando o sistema de coordenadas L\* a\* b\* (CIELab). As determinações foram efectuadas usando um padrão branco (L\*97,46; a\*-0,02; b\* 1,72) para calibração, nas mesmas condições de luz ambiente e a 20±1 °C, tendo sido efectuadas três réplicas em duplicado, para cada concentração de biomassa microalgal. Foram realizadas medições semanais, durante as primeiras quatro semanas (tendo início 24h após cozedura) e mensalmente, até ao 3º mês.

### **2.4. Análise de Textura**

A firmeza das bolachas foi avaliada semanalmente ao longo das primeiras 4 semanas (a primeira, foi efectuada 24 horas após cozedura) e mensalmente (2 e 3 meses), usando o texturómetro TA-XT2 Stable Micro System, UK, tendo sido efectuadas cinco réplicas em duplicado. Utilizou-se uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro que penetrou a bolacha a uma velocidade constante de 1 mm/s, até à profundidade de 4 mm. A resistência à penetração é medida em Força máxima (N) que corresponde ao pico máximo do textugrama, que traduz o valor de firmeza da bolacha. Os resultados foram analisados usando o programa Texture Exponent (TE.32, Stable Micro Systems).



## 2.5. Extração de Lípidos Totais

Para a extração lipídica das bolachas pesou-se 25g de amostra previamente triturada e homogeneizada, utilizando clorofórmio e metanol [7]. O perfil de ácidos gordos da microalga *I. galbana* e da fracção lipídica das bolachas (após preparação e mensalmente até ao 3º mês) foi determinado por cromatografia gás-líquido recorrendo ao processo de derivatização em ésteres metílicos através de hidrólise ácida [7]. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado.

## 2.6. Análise Estatística

Todos os resultados foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA - Post Hoc Comparisons – teste de Scheffé) para um nível de probabilidade  $p < 0,05$  usando o programa StatSoft STATISTICA, versão 6.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Cor

O uso de biomassa de *I. galbana*, permitiu a obtenção de bolachas de colorações apelativas, apresentando um aumento de tonalidade verde com o aumento de biomassa microalgal (Fig. 1).

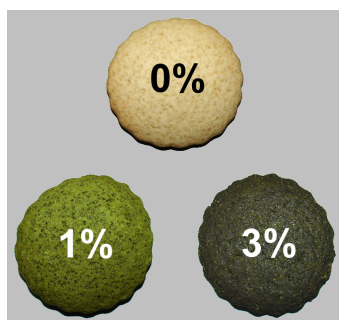
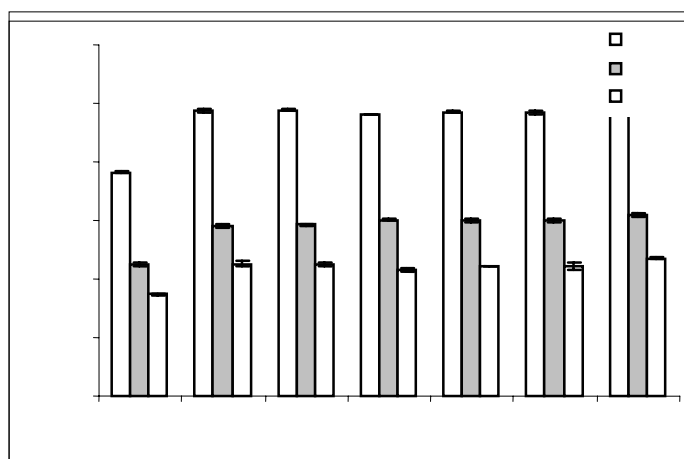


Fig. 1 – Bolachas com diferentes percentagens de incorporação de *Isochrysis galbana*

Os valores de  $L^*$  diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento de concentração de microalga, o que indica que a incorporação de biomassa de microalga resulta em bolachas mais escuras (Fig. 2) e mantiveram-se estáveis ao longo do período em estudo, após um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na 1ª semana, para todas as incorporações de microalga.

Para as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  não foi verificada uma relação directa com o aumento de concentração de microalga (Fig. 3). As bolachas com incorporação de *I. galbana* apresentaram valores negativos de  $a^*$  (tonalidade verde), enquanto que a bolacha controlo apresenta valores próximos de zero. O aumento de incorporação de microalga nas bolachas, conduz à obtenção de diferentes tonalidades, que variam do verde (com 1% de *I. galbana*) ao castanho (com 3% de *I. galbana*), com diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) (em valores absolutos) do parâmetro  $a^*$ .

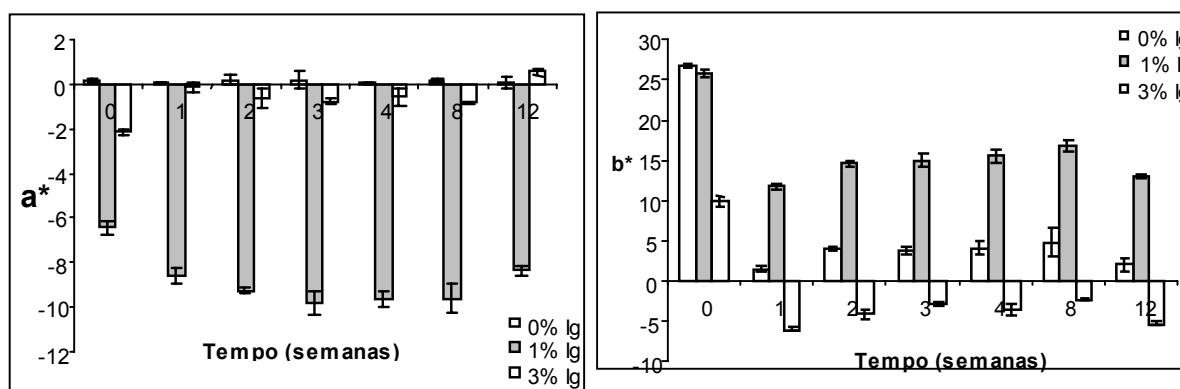
Nas bolachas com incorporação de microalga, foi observada uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) na 1ª semana de estudo; na bolacha com 1% de *I. galbana*,  $a^*$  aumentou (em valor absoluto) o que indica que a bolacha adquiriu uma tonalidade mais verde, enquanto que a bolacha com 3% de *I. galbana* tornou-se mais castanha (diminuição de  $a^*$ , em valor absoluto).



**Fig. 2** – Evolução do parâmetro L\* nas bolachas com diferentes concentrações de *Isochyris galbana*, ao longo do tempo

Após a 1ª semana o parâmetro a\* permaneceu estável, em todas as concentrações analisadas, para o período de tempo em estudo. Relativamente ao parâmetro b\*, as bolachas apresentaram valores muito diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), indicador de uma larga gama de colorações, apresentando uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na 1ª semana. Em seguida assistiu-se a um aumento ligeiro de b\*, em todas as concentrações estudadas, ainda que nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) seja encontrada no 1º mês de estudo.

Assim, verifica-se que a coloração das bolachas sofreu alterações consideráveis durante a 1ª semana, após manufactura das mesmas, sendo que posteriormente atingiu um equilíbrio. Tal facto é particularmente evidente na bolacha com 3% de incorporação de *I. galbana*, que inicialmente apresentou um valor de a\* negativo (verde) e b\* positivo (amarelo), que resulta em coloração verde, mudando posteriormente para uma coloração mais acastanhada (a\* perto de zero – menos verde; b\* negativo – azul).

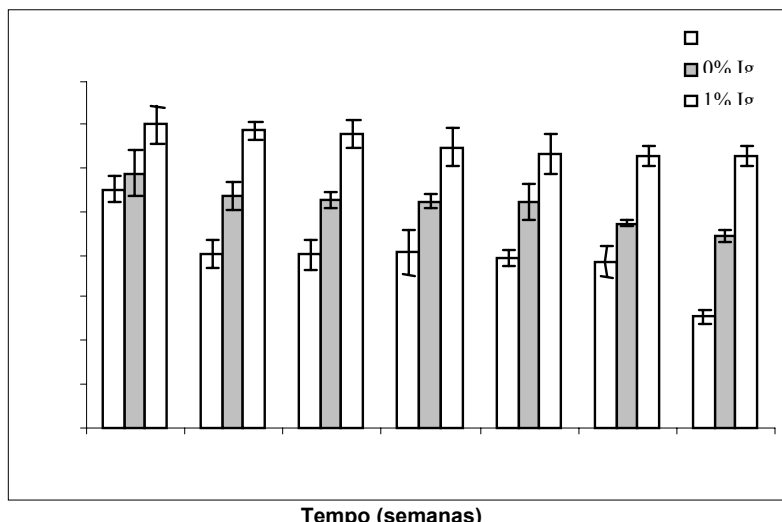


**Fig. 3** – Evolução dos parâmetros a\* e b\* nas bolachas com diferentes concentrações de *Isochyris galbana*, ao longo do tempo

### 3.2. Textura

A firmeza das bolachas aumentou linear ( $R^2 > 0,9$ ) e significativamente ( $p < 0,05$ ) com o aumento da concentração em microalga (Fig. 4). A textura das bolachas mostrou-se significativamente estável ( $p < 0,05$ ) ao longo do período de estudo, com uma ligeira descida

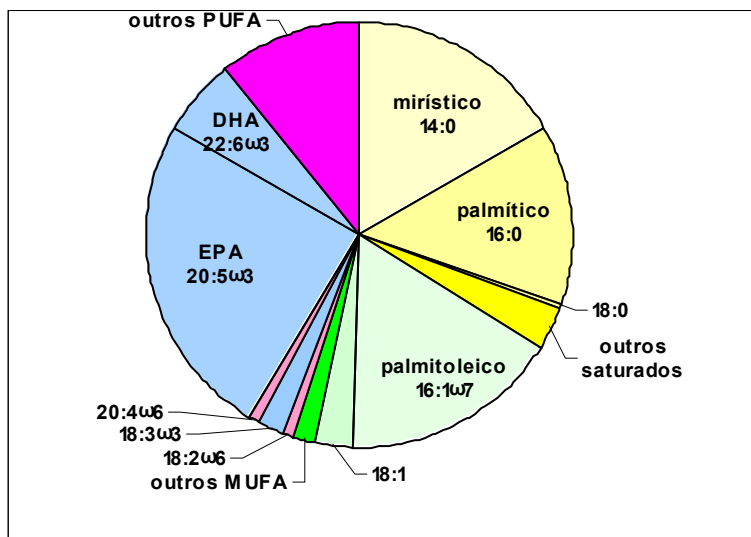
para todas as concentrações, excepto para a bolacha controlo (sem incorporação de *I. galbana*) na 1ª semana de estudo. Este resultado demonstra o efeito positivo da microalga como agente protector da estrutura da bolacha, facto que pode estar relacionado com o alto teor proteico da *I. galbana* (~40%) [8] que contribuirá para uma diminuição dos teores de água livre, contribuindo para o aumento da dureza das bolachas.



**Fig. 4** – Evolução da firmeza das bolachas com diferentes concentrações de *Isochrysis galbana*, ao longo do tempo

### 3.3. Perfil de Ácidos Gordos

O perfil de ácidos gordos da *I. galbana* (Fig. 5) revelou como grupo dominante, a presença dos PUFA's, seguido dos saturados e dos monoinsaturados (40%, 30% e 19% respectivamente), sendo o EPA (20:5 $\omega$ 3), o ácido gordo polinsaturado mais abundante.



**Fig. 5** – Perfil de ácidos gordos da microalga *Isochrysis galbana*

Dos saturados, os maioritários são o ácido mirístico (14:0) e o palmítico (16:0) (~ 49% e 41%, respectivamente). Dentro dos monoinsaturados, o ácido palmitoleico (16:1 $\omega$ 7) é o mais abundante, correspondendo a ~ 77% dessa fracção. Nos PUFA's verificou-se um nível de EPA particularmente alto (~55%), seguindo-se o DHA e o ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 $\omega$ 3) (13% e 5%, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com os reportados por outros autores [7, 9]. As bolachas apresentaram fracções lipídicas de aproximadamente 60% de ácidos gordos saturados (contributo da grande % de manteiga usada), 30% de ácidos gordos monoinsaturados e 6% e 9% de PUFA's (para as bolachas de 1% e 3% de incorporação de biomassa microalgal, respectivamente). Nas bolachas com incorporação de 3% de *I. galbana* verificaram-se os maiores teores de PUFA's (55% ácido linoleico, 15% EPA, 6% ácido  $\alpha$ -linolénico e 3% DHA).

As bolachas obtidas após cozedura apresentaram teores de PUFA's (EPA + DPA (ácido docosapentaenóico) + DHA) de ~100mg/100g e ~320mg/100g de bolacha, para as incorporações de 1% e 3% de biomassa microalgal, respectivamente, permitindo assim um bom aporte de  $\omega$ 3 na ingestão moderada de bolachas, uma vez que a DDR (Dose Diária Recomendada) é de 500 mg/dia de EPA+DHA [14]. Houve uma diminuição dos PUFA's ao longo do tempo, que poderá ser devida ao tipo de acondicionamento usado não permitir uma total como ausência de luz, vácuo e/ou atmosfera modificada.

#### 4. CONCLUSÕES

As bolachas, muito apreciadas pelo seu sabor, versatilidade, conveniência, textura e conservação, podem ser tanto atractivas como benéficas para a saúde, quando preparadas com a adição de biomassa da microalga *I. galbana*. Esta adição, como ingrediente funcional, permitiu a obtenção de bolachas ricas de ácidos gordos  $\omega$ 3 (ausência no controlo), apesar do processo térmico drástico durante a manufactura das mesmas. A resistência térmica dos ácidos gordos pode ser devida à sua presença na forma encapsulada, no interior da microalga. A incorporação mais vantajosa de biomassa de *I. galbana* parece ser de 1%, dada a cor mais apelativa, maior estabilidade de cor e textura, bem como um processo de manufactura mais fácil.

O melhoramento das propriedades texturais, a alta estabilidade da cor e textura, bem como o bom perfil em ácidos gordos polinsaturados (com ênfase no EPA e DHA) das bolachas obtidas com adição de *I. galbana*, revelaram-se bastante promissores ao aparecimento de um novo nicho de mercado alimentar.

#### REFERÊNCIAS

- [1] - C.M. Hasler - Food Technology **52** (1998) 57. [2] - M. Crawford - Am J Clinical Nutr **71** (2000) 275. [3] - F. Thies, J.M. Garry, P. Yagoob, K. Rerkasem, J. Williams, C.P. Shearman, P.J. Gallagher, P.C. Calder, R.F. Grimble - The Lancet **361** (2003) 477. [4] K.H. Bonaa, K.S. Bjerve, B. Staume, I.T. Gram, D. THELLE - The New England J Med **322** (1990) 795. [5] - A.P. Simopoulos (Ed) Health effects of  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids in seafood. Academic Press, Orlando (1986). [6] - S. Ötles, R. Pire J AOAC Inter **84** (6) (2001) 1708. [7] - N.M. Bandarra, P.A. Pereira, I. Batista, I., M.H. Vilela J Food Lip **10** (2003) 25. [8] - J.P. Fidalgo, A.T. Cid, A. Sukenik, C. Herrero, C. Aquac **166** (1988) 105. [9] - J.K. Volkman, D.J. Smith, G. Eglinton, G. J Mar Biol As UK **61** (1981) 509. [10] - J. Fábregas, C. Herrero, C. J Ind Microb (1990) 259. [11] - K. Flynn, M. Zapata, J. Garrido, H. Oepik, C. Hipkin. Eur J Phyc **28** (1993) 47. [12] - M.F. Piteira. PhD Thesis (2005) ISA, UTL. [13] - A. Raymundo, L. Gouveia, A.P. Batista, J. Empis, I. Sousa, I. (2005). Food Res. Inter **38** (8-9) (2005) 961. [14] - ISSFAL, (2004). Recommendations for dietary intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults.

# BENEFÍCIOS E PERIGOS ASSOCIADOS AOS PRODUTOS DA PESCA

*Nunes, M.L. \*, Bandarra, N. M. e Lourenço, H.M.*

Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INRB-IP/IPIMAR, Departamento de Inovação  
Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca  
Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa  
Tel +351 21 302 7036 Fax: +351 21 301 5948 \*e-mail: mlnunes@ipimar.pt

**Palavras-chave:** produtos da pesca, benefícios, perigos, ómega-3, contaminantes químicos

**Resumo:** Portugal é o país da UE com maiores consumos *per capita* de produtos da pesca, sendo uma importante fracção importada de zonas geográficas distantes. Tais produtos representam um importante papel na gastronomia e no sector do turismo pois há uma tradição de consumo diversificada que assenta numa enorme variedade de espécies e em preparações culinárias distintas. De entre os componentes benéficos destaca-se, para além das proteínas de elevado valor biológico, minerais e vitaminas, a elevada percentagem de ácidos gordos polinsaturados do tipo  $\omega$ 3, nomeadamente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Os principais perigos estão associados à presença de contaminantes químicos (principalmente metilmercúrio, dioxinas e PCB). Deste modo, é objectivo deste trabalho contribuir para a divulgação dos benefícios e perigos associados ao consumo de produtos da pesca e aquicultura.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma alimentação equilibrada e saudável que inclua uma diversidade de alimentos em proporções correctas de modo a proporcionar os níveis ideais dos nutrientes necessários e indispensáveis ao bom funcionamento do organismo humano é cada vez mais uma preocupação dos consumidores. Entre os alimentos disponíveis destacam-se os produtos da pesca não só pela grande diversidade de espécies disponível, mas também pelo valor nutricional e fácil digestão. Estes têm desempenhado um importante papel na alimentação, considerando-se que cerca de 14 % da proteína animal ingerida a nível mundial provém do pescado. A nível europeu há grandes diferenças entre os vários países no que respeita aos consumos *per capita*, estimando-se variações entre 8 e cerca de 60 kg/pessoa.ano, correspondendo este último valor a Portugal, o país com os consumos mais elevados na UE.

Nos últimos anos os consumos de pescado têm estabilizado ou mesmo diminuído devido à oferta de produtos mais convenientes e fáceis de preparar, facto que tem levado a indústria de processamento a dinamizar a preparação de produtos mais adequados à actual procura, nomeadamente produtos minimamente processados ou prontos a cozinhar ou a consumir.

A produção pesqueira nacional registou nos últimos anos uma tendência decrescente que tem sido compensada pela importação, pelo que está disponível uma maior diversidade de espécies. A produção nacional fornece essencialmente sardinha, carapau, peixe-espada-branco e preto, polvo, cavala e sarda enquanto que a importação permite o abastecimento de bacalhau, pescadas, crustáceos e alguns cefalópodes. Dos produtos de aquicultura destaca-se o consumo de dourada, robalo, moluscos bivalves e crustáceos. Associada a uma procura evolutiva de alimentos, assiste-se a uma maior preocupação dos consumidores quanto aos riscos associados a cada produto. Assim, é objectivo deste trabalho dar a conhecer alguns dos benefícios e perigos associados ao consumo destes produtos.

## 2. BENEFÍCIOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE PRODUTOS DA PESCA

Em Portugal é consumida uma enorme variedade de peixes, crustáceos e moluscos, apresentando-se no Quadro 1 dados nutricionais respeitantes a alguns dos produtos. Os teores

de proteína oscilam na quase totalidade das espécies entre 12 e 22 % e a distribuição de aminoácidos essenciais encontra-se bem balanceada; por outro lado, a relação entre aminoácidos essenciais e totais (41 a 45 %) [1] é muito próxima da encontrada na proteína do ovo ( $\approx 43\%$ ).

No que respeita à gordura, a maior parte dos peixes, crustáceos e moluscos apresenta teores inferiores a 2,5 % e apenas num pequeno número de espécies a percentagem é superior a 15 % (por exemplo salmão e sardinha na época de verão). A distribuição e quantidade de ácidos gordos saturados (SAT), monoinsaturados (MUFA), polinsaturados (PUFA) e da família ómega-3 ( $\omega 3$ ) variam consideravelmente de espécie para espécie e no caso das espécies de aquicultura é muito influenciada pela composição das rações. Em regra, o ácido palmítico (16:0) e o ácido oleico (18:1 $\omega 9$ ) são os mais relevantes no conjunto dos SAT e MUFA, respectivamente. Entre os PUFA destacam-se o 20:5 $\omega 3$  (EPA) e o 22:6 $\omega 3$  (DHA), sendo o último frequentemente o mais abundante.

Quadro 1. Valores nutricionais de alguns dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal\*

| Composição nutricional/100g | Bacalhau demolhado | Dourada (aquicultura) | Peixe-espada-preto | Pescada    | Polvo      | Sardinha    |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|------------|------------|-------------|
| Valor energético (kcal/kJ)  | 84,7/354,5         | 104,6/437,8           | 92,3/386,2         | 73,9/309,4 | 77,4/324,0 | 187,1/783,0 |
| Proteína (g)                | 19,0               | 18,8                  | 15,7               | 17,0       | 15,6       | 17,9        |
| Gordura total (g)           | 0,4                | 2,7                   | 2,8                | 0,7        | 1,2        | 10,9        |
| 16:0 (mg)                   | 51,0               | 423,9                 | 301,2              | 89,7       | 177,4      | 1695,3      |
| SAT (mg)                    | 67,9               | 693,0                 | 478,0              | 142,8      | 265,9      | 2745,9      |
| 18:1 (mg)                   | 37,7               | 517,9                 | 643,4              | 55,1       | 40,8       | 979,8       |
| MUFA (mg)                   | 52,7               | 760,7                 | 1621,8             | 110,3      | 90,1       | 2557,5      |
| 18:2 $\omega 6$ (mg)        | 3,7                | 24,4                  | 20,4               | 7,3        | 4,8        | 104,5       |
| 20:5 $\omega 3$ (mg)        | 35,2               | 57,6                  | 47,9               | 66,0       | 196,5      | 1671,8      |
| 22:6 $\omega 3$ (mg)        | 85,9               | 489,7                 | 139,5              | 155,3      | 225,3      | 1169,4      |
| PUFA (mg)                   | 138,7              | 778,6                 | 234,8              | 273,4      | 560,0      | 4071,0      |
| PUFA $\omega 3$ (mg)        | 127,6              | 704,4                 | 210,8              | 246,9      | 496,9      | 3753,3      |
| PUFA $\omega 6$ (mg)        | 11,1               | 74,2                  | 24,0               | 26,6       | 63,1       | 317,7       |
| Colesterol (mg)             | 52                 | 36                    | 24                 | 19         | 64         | 28          |
| Calcio (mg)                 | 33                 | 7,3                   | 14                 | 15         | 13         | 70          |
| Fósforo (mg)                | 116                | 256                   | 181                | 219        | 165        | 296         |
| Magnésio (mg)               | 23                 | 32                    | 29                 | 26         | 43         | 29          |
| Ferro (mg)                  | 0,2                | 0,4                   | 0,1                | 0,5        | 0,7        | 1,7         |
| Sódio (mg)                  | 1483               | 104                   | 138                | 69         | 259        | 65          |
| Potássio (mg)               | 36                 | 369                   | 332                | 408        | 236        | 404         |
| Manganês (mg)               | <0,02              | <0,02                 | <0,02              | <0,02      | <0,02      | <0,02       |
| Cobre (mg)                  | <0,03              | 0,04                  | <0,03              | <0,03      | 0,21       | <0,03       |
| Zinco (mg)                  | 0,8                | 0,7                   | 0,5                | 0,7        | 1,3        | 1,7         |
| Cloro (mg)                  | 1990               | 119                   | 176                | 85         | 438        | 152         |
| Vit. A ( $\mu\text{g}$ )    | 3,8                | 19                    | 23                 | 2,8        | 2,7        | 12          |
| Vit. B6 (mg)                | 0,072              | 0,41                  | 0,16               | na **      | 0,067      | 0,41        |
| Vit. B12 ( $\mu\text{g}$ )  | 0,95               | na                    | na                 | 0,63       | 1,3        | 10          |
| Vit. D ( $\mu\text{g}$ )    | 4,5                | 15                    | 2,1                | 5,6        | 0          | 17          |
| Vit. E (mg)                 | 0,28               | 0,70                  | 1,1                | 0,24       | 0,73       | 0,025       |

\* Adaptado de [2]; \*\* não analisado

Os níveis de colesterol, na grande maioria dos peixes e crustáceos, oscilam entre 20 e 90 mg/100g e nos cefalópodes é normalmente mais elevada, podendo atingir cerca de 160 mg/100g, contudo a presença de quantidades apreciáveis de taurina nestas espécies contribui para reduzir a sua absorção. No que respeita aos minerais, a maioria das espécies apresenta na parte edível teores ao redor de 1g /100g e o perfil de distribuição em termos quantitativos na maior parte das espécies é potássio>cloro~fósforo>sódio>magnésio>cálcio>zinco>ferro>

cobre>manganês. Alguns destes constituintes são indispensáveis à formação óssea e manutenção dos sistemas celulares e, ainda, activadores de hormonas e enzimas. No caso do bacalhau salgado/seco/demolhado, o sódio e o cloro são os mais abundantes. Quanto às vitaminas, é de salientar a presença da A, B6 (piridoxina), B12 (cobalamina), D e E em muitos produtos da pesca.

De entre os vários constituintes atrás referidos os ácidos gordos  $\omega 3$  são os que mais contribuem para os benefícios associados ao consumo de produtos da pesca. Assim, desde as observações feitas no início da segunda metade do século passado em esquimós da Gronelândia, cuja base de alimentação era peixe, e nos quais se verificava uma baixa incidência de doenças coronárias apesar do consumo de elevadas quantidades de gordura e colesterol, foram publicados nas últimas décadas muitos trabalhos que pretendem avaliar a relação entre o consumo de produtos da pesca e o aparecimento/prevenção de doenças do foro cardiovascular. Um número significativo destes estudos, sobretudo os de natureza epidemiológica, tem evidenciado uma redução significativa de mortalidade cardiovascular em grupos com elevado consumo de pescado ou em que a ingestão de EPA e DHA foi aumentada. De acordo com a literatura da especialidade, sobretudo Medline Database [3], estes ácidos gordos, em particular o EPA, têm efeitos protectores no que respeita a prevenção da doença coronária (CHD), redução de arritmias e de trombose, diminuição do nível de triglicéridos no plasma e aumento da fluidez do sangue. De entre os vários estudos realizados destaca-se o GISSI [4] no qual se demonstra que em mais de 11300 doentes pós-EAM (enfarte agudo do miocárdio), a suplementação dietética ao longo de 35 anos com 850 mg/dia de ácidos gordos  $\omega 3$  (EPA+DHA) em comparação com o tratamento usual protocolado, diminuiu em 20 % o risco de morte por todas as causas e o risco de morte súbita em 45% no grupo de doentes tratados com ácidos gordos  $\omega 3$ .

Mais recentemente, Mozaffarian [5] avaliou os benefícios globais associados ao consumo de produtos da pesca com base em mais de uma centena de trabalhos publicados e concluiu que o consumo de peixe ou óleos de peixe pode baixar o risco relativo da doença coronária fatal até 36 % (intervalo de confiança 95 %, 20 %-50 %;  $P < 0,001$ ) e de morte súbita até 17 % (intervalo de confiança 95 %, 0 %-32 %;  $P = 0,046$ ). Assim, consumos diários de EPA e DHA compreendidos entre 250 e 500 mg/dia em comparação com consumos nulos ou muito baixos conduzem a uma redução do risco relativo da doença coronária pelo menos de 25 % enquanto consumos mais elevados não parecem contribuir para aumentar a redução desse risco. Todavia, em pacientes com CHD os consumos podem ir até 1000 mg/dia. Este mesmo autor conclui ainda que a diminuição do risco relativo está mais associada à ingestão de peixe gordo, por exemplo salmão, arenque e sardinha, do que a peixe magro (bacalhau e pescada). Mozaffarian [5] discute, igualmente, o papel do consumo de peixe noutras patologias, todavia a certeza da evidência é inferior. Apesar desta enorme diversidade de dados e evidências que suportam o efeito protector dos ácidos gordos  $\omega 3$  há ainda alguma conflituosidade na aceitação de algumas conclusões que decorre da inclusão de indivíduos com saúde muito diferente nos vários grupos bem como de diferentes desenhos experimentais, eventos de referência, tipos de peixe e formas dos ácidos gordos nos suplementos.

Estudos recentes realizados *in vitro* têm mostrado que o consumo excessivo de ácidos gordos  $\omega 3$  pode alterar a resposta imunitária ao causar tempos de coagulação prolongados de que podem resultar choques hemorrágicos e lesões oxidativas em vários tecidos. O possível efeito negativo dos ácidos gordos  $\omega 3$  na supressão imunitária foi comprovado através da ingestão de níveis muito elevados de EPA e DHA [4], [6], [7], [8]. Mais recentemente, Kew *et al.* [9], concluíram que a ingestão de teores de cerca de 1,7 g/dia de EPA e DHA (menos de duas porções de peixe gordo) não altera as actividades funcionais das células inflamatórias quer em

homens quer em mulheres saudáveis. Com base nestes e noutros estudos, a FDA recomendou que a ingestão individual de EPA e DHA na alimentação e nos suplementos não deve exceder as 3 g/dia [10].

### **3. PERIGOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE PRODUTOS DA PESCA**

Os perigos potenciais associados ao consumo dos produtos da pesca são devidos principalmente à presença de contaminantes de origem industrial ou natural (nomeadamente metais pesados, dioxinas e PCB), contaminantes resultantes do processamento alimentar, biotoxinas marinhas e microrganismos patogénicos. Todavia, podem resultar também da adição voluntária de produtos na produção primária ou na transformação tais como aditivos alimentares e resíduos de medicamentos veterinários e ainda de substâncias que migram dos materiais com os quais os produtos da pesca estão em contacto. Porém, no contexto deste trabalho apenas se irão abordar os primeiros.

Do conjunto dos chamados metais pesados, tem sido dada particular atenção ao mercúrio, cádmio e chumbo. O mercúrio é um elemento que existe naturalmente no meio ambiente e a sua concentração tem vindo a aumentar devido à crescente poluição provocada pelas emissões gasosas e à actividade humana e industrial. No meio aquático, o mercúrio encontra-se principalmente na forma inorgânica ( $\text{Hg}^0$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ), sendo convertido por acção bacteriana, sobretudo em metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), uma forma orgânica muito tóxica e que constitui cerca de 90 % mercúrio existente no pescado.

Quando presente em concentrações baixas, o mercúrio não representa um perigo toxicológico elevado para os consumidores, todavia a sua acumulação a longo prazo pode ser nefasta, pois é eliminado lentamente pelo organismo humano. A ingestão de mercúrio em quantidades excessivas pode alterar o sistema neurológico, provocando entorpecimento dos membros, dores de cabeça, irritabilidade, problemas de visão e de audição, graves lesões cerebrais, coma e até morte. Dois estudos japoneses [11] e um iraquiano [12] reportam danos neurológicos e morte devido ao consumo de peixe com concentrações de mercúrio entre 9 e 40  $\mu\text{g/g}$ . O maior risco da ingestão de peixe está associado à presença de metilmercúrio que afecta sobretudo o sistema nervoso e é particularmente perigoso para crianças com o sistema nervoso em desenvolvimento. Assim, de acordo com [13] o cérebro fetal parece ser muito susceptível a danos causados pelo metilmercúrio, uma vez que inibe a migração de células neuronais e rompe a arquitectura do cérebro em desenvolvimento.

De um modo geral, todas as espécies aquáticas contêm mercúrio, mas as do topo da cadeia alimentar, devido ao seu tamanho, idade e actividade predadora são as que apresentam níveis mais elevados, distinguindo-se entre estas algumas espécies de atum e de tubarões. Todavia, na maioria dos casos, não foi ainda estabelecida uma relação entre os valores usualmente encontrados no pescado e as possíveis causas. Este facto levou ao estabelecimento de um teor máximo de 0,5 mg/kg de peixe (0,5 ppm) para a maioria das espécies e de 1 mg/kg de peixe (1 ppm) para algumas espécies particulares, conforme referido no Regulamento (CE) 1881 [14]. No Quadro 2 apresentam-se valores encontrados em algumas das espécies mais consumidas em Portugal. Em cerca de metade foram detectados níveis de mercúrio superiores aos valores limite, destacando-se entre estas as espécies cartilagosas, com excepção da raia. No entanto, é de referir que em muitas destas espécies foram igualmente detectados níveis muito baixos. Esta variabilidade está relacionada não só com o tamanho dos exemplares, mas também com a área de captura.

A presença de cádmio e chumbo pode constituir igualmente um risco para a saúde. Assim, o primeiro pode acumular-se no corpo humano e induzir disfunção renal, doenças ósseas e deficiências na função reprodutora, não sendo possível ainda excluir que possa actuar como



agente cancerígeno. Os limites propostos pela UE [14] para diferentes espécies de peixe oscilam entre 0,050 e 0,30 ppm, para crustáceos é de 0,50 ppm e para moluscos bivalves e cefalópodes é 1,0 ppm. Por seu lado, o chumbo pode causar a redução do desenvolvimento cognitivo e do desempenho intelectual das crianças, aumentar a pressão arterial e fomentar as doenças cardiovasculares. Os níveis de chumbo têm diminuído de modo significativo na última década em resultado de medidas tendentes a reduzir a sua emissão para o ambiente. Os limites actualmente indicados pela UE [14] são 0,30 ppm para diferentes espécies de peixe, 0,50 ppm para crustáceos, 1,0 ppm para cefalópodes (sem vísceras) e 1,5 ppm para moluscos bivalves. Na maioria das espécies comercializadas em Portugal os teores de cádmio e chumbo são muito inferiores aos limites indicados.

Embora na maioria dos produtos da pesca os níveis de mercúrio não sejam muito elevados, a comunidade médica tem manifestado preocupação quanto à possibilidade de este metal poder anular não só os efeitos benéficos dos ácidos gordos  $\omega 3$ , mas também contribuir para agravar o risco das doenças cardiovasculares, uma vez que têm sido publicados estudos neste sentido [15].

Quadro 2. Teores de mercúrio em algumas das espécies mais consumidas em Portugal\*

| Espécie    | Teor (ppm) | Limite (ppm) | Espécie            | Teor (ppm) | Limite (ppm) |
|------------|------------|--------------|--------------------|------------|--------------|
| Abrótea    | 0,08-0,47  | 0,5          | Pargo              | 0,09-0,87  | 0,5          |
| Anequim    | 0,44-1,05  | 1,0          | Pargo-mulato       | 0,04-0,15  | 0,5          |
| Atum       | 0,28-0,65  | 1,0          | Peixe-espada       | 0,08-0,83  | 1,0          |
| Besugo     | 0,10-0,71  | 0,5          | Peixe-espada-preto | 0,34-1,54  | 1,0          |
| Bica       | 0,16-0,23  | 0,5          | Peixe-galo         | 0,04-0,11  | 0,5          |
| Cação      | 0,76-2,97  | 1,0          | Pescada            | 0,04-0,14  | 0,5          |
| Cachucho   | 0,11-0,42  | 0,5          | Pescada-bicuda     | 0,25-0,44  | 0,5          |
| Cantaril   | 0,16-0,96  | 0,5          | Polvo              | 0,01-0,16  | 0,5          |
| Cantarilho | 0,24-0,48  | 1,0          | Polvo-cabeçudo     | 0,06-0,08  | 0,5          |
| Carapau    | 0,04-0,13  | 0,5          | Pota-costeira      | 0,06-0,12  | 0,5          |
| Carta      | 0,23-1,89  | 0,5          | Pota-voadora       | 0,07-0,15  | 0,5          |
| Cavala     | 0,05-0,11  | 0,5          | Raia               | 0,07-0,25  | 1,0          |
| Cherne     | 0,13-1,14  | 0,5          | Rascasso pintas    | 1,14       | 1,0          |
| Chicharro  | 0,16-0,55  | 0,5          | Robalo             | 0,01-0,12  | 1,0          |
| Choco      | 0,06-0,13  | 0,5          | Safio              | 0,13-0,80  | 0,5          |
| Choupa     | 0,05-0,17  | 0,5          | Salmonete          | 0,06-0,63  | 0,5          |
| Corvina    | 0,03-0,29  | 0,5          | Salmão             | 0,01-0,06  | 0,5          |
| Dourada    | 0,03-0,10  | 0,5          | Sarda              | 0,05-0,06  | 0,5          |
| Espadarte  | 0,07-1,02  | 1,0          | Sardinha           | 0,04-0,07  | 0,5          |
| Faneca     | 0,11-0,66  | 0,5          | Sargo              | 0,10-0,58  | 0,5          |
| Garoupa    | 0,09-0,29  | 0,5          | Solha              | 0,02-0,10  | 0,5          |
| Goraz      | 0,21-1,02  | 0,5          | Tamboril           | 0,10-0,65  | 1,0          |
| Linguado   | 0,03-0,45  | 0,5          | Tintureira         | 0,77-5,09  | 1,0          |
| Lula       | 0,07-0,14  | 0,5          | Truta              | 0,04-0,13  | 0,5          |
| Moreia     | 0,22-0,54  | 0,5          | Zorro              | 2,33       | 1,0          |

\* Adaptado de [16]

As dioxinas e os PCB são compostos organoclorados que se encontram no ambiente e como tal podem estar presentes nos produtos da pesca, embora seja na carne e nos lacticínios que expectavelmente os teores sejam mais elevados. Os níveis destes contaminantes são muito distintos de região para região, facto que se reflecte nos níveis encontrados nos produtos da

pesca. Assim, por exemplo os peixes do mar Báltico apresentam níveis de contaminação duas vezes superiores aos do mar do Norte. Além da origem geográfica, registam-se também variações ao nível das espécies, apresentando os peixes gordos teores mais elevados pelo facto destes compostos se concentrarem na gordura. Estudos em animais e observações clínicas em pacientes indicam que estes compostos podem ser considerados cancerígenos e causar vários tipos de lesões cutâneas. Todavia, de acordo com a US Environmental Protection Agency [15] os consumos usuais de produtos da pesca não indiciam riscos de cancro. A UE [14] propôs valores limite para a maior parte dos peixes (4,0 pg dioxinas/g de peso fresco ou 8,0 pg dioxinas e PCB sob a forma de dioxina/g de peso fresco). Os valores encontrados nas espécies mais consumidas na Europa são inferiores ao limite proposto pelo que o impacto do seu consumo não é significativo em termos de saúde.

#### 4. CONCLUSÕES

Os produtos da pesca devem ser considerados como um alimento indispensável numa dieta equilibrada. Os estudos epidemiológicos e clínicos demonstram que os ácidos gordos  $\omega$ 3 diminuem a incidência das doenças cardiovasculares e, para a população em geral, ingestões diárias até 500 mg de EPA+DHA parecem ser suficientes para as prevenir. Este teor corresponde ao consumo semanal de cerca de 180 g de peixe gordo. Todavia, pacientes com problemas cardiovasculares podem ingerir até 1000 mg/dia. Para a prevenção de outras patologias não existem ainda doses diárias sugeridas. De preferência, os consumidores devem tentar diversificar o consumo, seleccionando espécies com baixos teores de mercúrio.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento pelo projecto QCA III MARE22-05-01-FDR-0041 “Benefícios e Perigos Associados aos Produtos da Pesca” e pelo projecto “Quality of life – integrated benefit and risk analysis. Web – based tool for assessing food safety and health benefit”, QALIBRA(UE N° 022957).

#### Referências

- [1] – N.M. Bandarra, M.A. Calhau, L. Oliveira, M. Ramos, M.G. Dias, H. Bártolo, M.R. Faria, M.C. Fonseca, J. Gonçalves, I. Batista, M.L. Nunes. 2004. Publicações Avulsas do IPIMAR **11** (2004)
- [2] – J.B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, J. Oehlenschäger (ed.) – *Seafood research from fish to dish*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen (2006)
- [3] – Medline Online Computer Database – National Library of Medecines, NLM Files (2006)
- [4] – Gissi-Prevenzione Trial. *Lancet* **354** (1999) 447
- [5] – D. Mozaffarian – *JAMA* **296** (2006) 1885
- [6] – D.S. Kelley, P.C. Taylor, G.J. Nelson, B.E. Mackey - *Lipids* **33** (1998) 559
- [7] – D.S. Kelley, P.C. Taylor, G.J. Nelson, B.E. Mackey - *Lipids* **34** (1999) 317
- [8] – T.H. Lee, R.L. Hoover, J.D. Williams - *N Engl J Med* **312** (1985) 1217
- [9] – S. Kew, T. Banerjee, A. - *Am J Clin Nutr* **77** (2003) 1287
- [10] – Food and Drug Administration - Federal Register **62** (1997) 30751
- [11] – K. Eto, S. Oyanagi, Y. Itai, H. Tokunaga, Y. Takizawa, I. Suda - *Mol Chem Neuropathol.* **16** (1992) 171
- [12] – F. Bakir, S.F. Damluji, L. Amin-Zaki - *Science* **181** (1973) 230
- [13] – T.W. Clarkson, L. Mago, G. Meyers. - *N Engl J Med.* **18** (2003) 1731
- [14] – UE *Regulamento (CE) n° 1881/2006* – JO L 364 (2006) 5
- [15] – US Environmental Protection Agency – Risk Assessment and Fish Consumption Limits 3<sup>rd</sup> ed (2003)
- [16] – I. Batista, M. L. Nunes, A. Martins, N. Delgado, A. Mendes - *Monitorização da Qualidade do Pescado Fresco e Refrigerado Descarregado em Lota*, IPIMAR (2001)

# CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO EM FENOL DE MÉIS PORTUGUESES E A RESPECTIVA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DO ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM POLPA DE BANANA E PERA

*Silva, C.C.G.\*; Dapkevicius, A. e Dapkevicius, E.M.L.N.*

CITA-A, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias  
Terra-Chã, 9701-851 Angra do Heroísmo  
Tel +351295402200 Fax +351295402205 e-mail: célia@mail.angra.uac.pt

**Palavras-chave:** mel, fenol, anti-oxidante, escurecimento enzimático, polifenoloxidase

**Resumo:** Nos últimos anos tem aumentado o interesse na utilização do mel com fonte natural de antioxidantes e no controlo do escurecimento enzimático de frutos. Apesar destas propriedades do mel variarem largamente de acordo com a sua origem floral, muito pouco se conhece sobre o conteúdo em fenóis e actividades antioxidantes dos méis portugueses. As ilhas dos Açores, em particular, possuem uma flora específica e endémica que poderá influenciar estas características.

O presente estudo avaliou a actividade antioxidante de 16 méis Portugueses de diferentes origens geográficas (12 meis produzidos nos Açores e 4 produzidos em Portugal Continental), relacionando-a com o seu conteúdo em fenóis. Estes méis foram também avaliados na sua capacidade em inibir o escurecimento enzimático em polpas de banana (*Musa acuminata*) e pêra rocha (*Pyrus Communis L.*). As actividades antioxidantes das amostras de mel foram determinadas por espectrometria, através da redução de um radical livre estável (DPPH), e expressas em microequivalentes ( $\mu\text{eq}$ ) de ácido ascórbico. Os fenóis foram extraídos do mel com uma resina Amberlite XAD-2 e quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. Um método espectrofotométrico foi também utilizado para avaliar a eficácia dos méis para inibir o escurecimento enzimático em polpas de banana e pêra.

As amostras de mel analisadas apresentaram uma marcada variação na actividade antioxidante, variando entre  $5.4 \times 10^{-4}$  e  $43.9 \times 10^{-4}$   $\mu\text{eq}/\text{mg}$ . Ambos os valores mais elevados e mais baixos foram observados em amostras de Portugal Continental (Trás-os-Montes e Alentejo, respectivamente). Foi observada uma correlação elevada ( $r=0,837$ ) entre o conteúdo em fenóis e as actividades antioxidantes dos méis, demonstrando um papel importante dos compostos fenólicos na actividade antioxidante. Foi também observada uma correlação positiva ( $r=0,729$ ) entre os valores de pH e a actividade antioxidante dos méis. Méis de diferentes origens geográficas apresentaram também diferente potencial em inibir o escurecimento enzimático nas polpas de banana e pêra. Foi observada uma correlação negativa ( $r=-0,589$ ) entre o conteúdo em fenóis e a inibição enzimática da pêra. No entanto, a correlação negativa ( $r=-0,410$ ) observada entre o pH dos méis e a inibição do escurecimento da banana indica que este fruto será mais susceptível à inibição produzida por méis com um pH mais baixo. De um modo geral, os méis dos Açores tendem a ter valores mais baixos de pH, sendo assim mais eficazes na inibição do escurecimento enzimático das bananas produzidas localmente. Deste modo, e apesar dos méis portugueses variarem muito nas suas propriedades antioxidativas, alguns poderão proporcionar uma boa fonte de antioxidantes e ser utilizados no controlo do escurecimento enzimático de frutos.

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos de origem vegetal tem sido associado a uma diminuição do risco de doenças crónicas e degenerativas como as doenças cardiovasculares, cancro, diabetes e envelhecimento. Esta protecção proporcionada pelo consumo destes alimentos pode ser explicada pela presença de anti-oxidantes que protegem contra os radicais livres responsáveis pela degradação dos lípidos, ácidos nucleicos e proteínas. Anti-oxidantes sintéticos como o

BHA, BHT e TBHT são actualmente utilizados como aditivos alimentares para prevenir a deterioração dos alimentos (e.g. oxidação lipídica na carne, escurecimento enzimático em frutos e vegetais). No entanto, alguns estudos apontam para um possível efeito pró-carcinogénico destes antioxidantes sintéticos<sup>1,2</sup>. Deste modo, tem aumentado o interesse pela utilização de anti-oxidantes de origem natural, nomeadamente certas especiarias, ervas aromáticas e mel<sup>3,4,5</sup>.

O mel tem sido utilizado desde tempos antigos não apenas como adoçante, mas também como agente terapêutico na medicina popular. Mais recentemente, foi demonstrado que o mel tem um efeito potencial em reduzir as reacções oxidativas nos alimentos<sup>6,7,8</sup>. Os antioxidantes que ocorrem naturalmente no mel e que contribuem para a sua actividade antioxidante incluem compostos fenólicos, alguns enzimas (e.g. glucose oxidase, catalase), ácidos orgânicos (e.g. ácido ascórbico), carotenóides, aminoácidos e proteínas<sup>9</sup>. No entanto, a actividade anti-oxidante do mel pode variar largamente dependendo da sua origem floral, devido possivelmente a diferenças no conteúdo em metabolitos secundários derivados das plantas. Dada a especificidade da flora açoriana, é possível que o mel produzido nos Açores possua propriedades particulares que possam permitir a sua utilização como anti-oxidante e/ou conservante alimentar.

Além da actividade antioxidante, o mel também tem sido estudado com uma alternativa ao uso de sulfitos no controlo do escurecimento enzimático de frutos<sup>10</sup>. O escurecimento enzimático de frutos e vegetais ocorre após a colheita, durante o seu manuseamento e processamento. Resulta da reacção do oxigénio (ar) com certos compostos fenólicos, catalisada pela polifenoloxidase (*o*-difenol:oxigénio oxidorreductase, EC 1.10.3.1), produzindo quinonas, que polimerizam para formar produtos acastanhados. O escurecimento enzimático dos alimentos é normalmente considerado como prejudicial, pois reduz a aceitabilidade do alimento. Por esta razão, um grande esforço tem sido empregue na investigação de métodos efectivos para a eliminação do escurecimento enzimático<sup>10,11,12</sup>. Deste modo, o presente trabalho teve como objectivo examinar a actividade antioxidante do mel proveniente de diversas regiões de Portugal, com especial incidência na região Açores, relacionando-a com o conteúdo em fenóis e a capacidade em inibir o escurecimento enzimático em homogenatos de banana (*Musa acuminata*), produzida nos Açores, e pêra rocha (*Pyrus Communis* L.), produzida em Portugal Continental.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras:**

No total, foram testados 16 méis Portugueses de diferentes origens geográficas (12 méis produzidos nos Açores e 4 produzidos em Portugal Continental). Os méis açorianos analisados incluem 7 amostras da ilha de São Miguel, 4 amostras da ilha Terceira e 1 amostra da ilha do Pico. As amostras de mel produzidas em Portugal Continental provêm das regiões de Trás-os-Montes, Caramulo, Alentejo e Algarve.

### **2.2. Determinação do pH:**

As amostras de mel foram diluídas a 50% (p/v) e determinado o pH por potenciometria.

### **2.3. Determinação do conteúdo total de fenóis:**

Os fenóis foram extraídos das amostras de mel utilizando o método descrito por Andrade *et al.* (1997)<sup>13</sup>, com algumas modificações. As amostras de mel (4 g) foram diluídas (1:5) com água ajustando-se a pH 2 (com HCl), filtrando-se em seguida por algodão para remover as partículas sólidas. O filtrado foi adicionado a 6 g de Amberlite XAD-2 (Supelco) e misturado

durante 10 min., utilizando um agitador magnético. Passou-se esta mistura para uma coluna, lavando-se com 20 mL de água acidificada com HCl (pH 2) e posteriormente com 25 mL de água destilada. Os compostos fenólicos presentes no mel ficam retidos na coluna, enquanto que outros compostos polares são eluídos pelo solvente aquoso. Finalmente, a fracção fenólica foi eluída com metanol (30 mL) e evaporada (40°C) sob vácuo. O resíduo final foi diluído em metanol (1 mL) para análise do conteúdo em fenol.

O conteúdo total de fenóis foi analisado pelo método micro Folin-Ciocalteu<sup>14</sup>. O extracto (20 µL) foi adicionado a 1.58 mL de água destilada e 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Merck). Após 5 min. foram adicionados 300 µL de uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo lida a absorvância a 765 nm (espectrofotómetro de duplo feixe Hitachi U-2000). Foi realizada uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de ácido gálico (50 – 500 mg/L). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de mel.

#### **2.4. Determinação da actividade antioxidante:**

A capacidade antioxidante dos diferentes méis foi avaliada por espectrofotometria pelo método descrito por Chen *et al.* (2000)<sup>10</sup>. Este método baseia-se na medição da absorvância a 517 nm quando um radical livre, 2,2-diphenil-1-picril-hydrazyl (DPPH, Sigma) reage com um antioxidante. As amostras de mel foram diluídas em água para concentrações de 0.1 e 0.2 g/mL. Destas diluições foi retirada uma amostra de 0.75 mL e foi adicionado 1.5 mL de DPPH em metanol (0.1 mg/mL). Após a mistura deixou-se em repouso durante 5 min. no escuro, sendo lida a absorvância a 517 nm. Foi realizada uma curva de calibração utilizando ácido ascórbico (0 – 0.03 mg/mL). Os resultados foram expressos em microequivalentes (µeq) de antioxidante por mg de mel (µeq/mg), sendo que 1 µeq de antioxidante refere-se à capacidade para reduzir uma micromole de um pró-oxidante.

#### **2.5. Determinação da eficácia dos méis na inibição do escurecimento enzimático:**

A inibição do escurecimento enzimático por parte das diferentes amostras de mel foi determinada por espectrofotometria, segundo Chen *et al.* (2000)<sup>10</sup>. Prepararam-se homogenatos com a polpa de banana regional e pêra rocha, utilizando um triturador (Brawn, 600 W) e mantendo a polpa em gelo. Imediatamente, pesou-se 25 g do homogenato e adicionou-se 0.5 mL de mel diluído em água (50 g/100 mL). Incubou-se durante uma hora à temperatura ambiente (aprox. 20 °C) com agitação constante (agitador magnético). Utilizou-se um controlo com água destilada (0.5 mL) e um segundo controlo com uma solução de sulfito de sódio (concentração final 0.25 g/mL) para inibir o escurecimento enzimático. Após a incubação, 2.5 g de homogenato foi extraído com 10 mL de metanol aquoso (80% v/v) por agitação no vortex. O extracto resultante foi centrifugado a 1000 g, a 4 °C, durante 10 min. A absorvância de cada sobrenadante foi determinada a 420 nm contra um branco de metanol aquoso. Os resultados foram expressos em unidades de escurecimento que correspondem à diferença de 0.01 unidades de absorvância entre o branco (polpa com água destilada) e a polpa de fruta (homogenato) com mel. Deste modo, 1 unidade de escurecimento é o equivalente à diferença de absorvância de 0.01 do controle, por grama de homogenato. Um valor mais elevado indica um maior efeito na inibição do escurecimento enzimático.

#### **2.6. Análise estatística:**

Todas as determinações foram realizadas em triplicado. Foram efectuadas correlações entre o conteúdo total em fenol e a capacidade antioxidante das diferentes amostras de mel bem como índice de escurecimento enzimático. Foram ainda realizadas correlações entre o pH e os respectivos valores de capacidade antioxidante e escurecimento enzimático.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH, conteúdo total em fenóis, actividade antioxidante e índice de escurecimento enzimático estão indicados no quadro 1.

**Quadro 1** - Identificação (origem geográfica) das amostras de mel e respectivos valores de pH, conteúdo em fenóis totais, actividade antioxidante e índice de escurecimento enzimático em polpa de banana e pêra rocha. Os valores indicados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de três determinações. Os índices de escurecimento enzimático do bissulfito de sódio na banana e na pêra rocha foram de  $0.79 \pm 0.18$  e  $0.94 \pm 0.03$  unidade/g, respectivamente.

| Mel<br>Origem geográfica        | pH   | Fenóis totais<br>(mg GAE/100g $\pm$ SEM) | Actividade antioxidante<br>( $10^{-4}$ $\mu$ eq/mg $\pm$ SEM) | Índice de escurecimento<br>enzimático (unidade/g $\pm$ SEM) |                 |
|---------------------------------|------|--|---|---|-----------------|
|                                 |      |  |   | Banana  | Pêra Rocha      |
| São Miguel<br>(Quinta do Além)  | 3.12 | 91.5 $\pm$ 3.6                           | 9.8 $\pm$ 0.0   | 0.19 $\pm$ 0.06   | IA*             |
| São Miguel<br>(Água de Pau)     | 3.25 | 104.2 $\pm$ 6.7                          | 14.4 $\pm$ 0.2  | 0.34 $\pm$ 0.22   | 0.21 $\pm$ 0.01 |
| São Miguel<br>(Candelária)      | 3.21 | 113.5 $\pm$ 4.6                          | 11.4 $\pm$ 0.1  | 0.22 $\pm$ 0.08   | 0.11 $\pm$ 0.04 |
| São Miguel<br>(Ribeira Grande)  | 3.4  | 236.2 $\pm$ 1.5                          | 29.9 $\pm$ 0.1  | IA*   | IA*             |
| São Miguel<br>(Fajã de Cima)    | 3.6  | 136.3 $\pm$ 11.9                         | 13.2 $\pm$ 0.5  | 0.21 $\pm$ 0.5  | 0.27 $\pm$ 0.05 |
| São Miguel                      | 3.25 | 112.5 $\pm$ 4.9                          | 11.2 $\pm$ 0.1  | 0.54 $\pm$ 0.30   | 0.24 $\pm$ 0.12 |
| São Miguel                      | 3.5  | 109.7 $\pm$ 3.7                          | 10.9 $\pm$ 0.1  | IA*   | 0.23 $\pm$ 0.08 |
| Terceira                        | 3.24 | 98.8 $\pm$ 4.0                           | 13.6 $\pm$ 0.0  | IA*   | 0.13 $\pm$ 0.05 |
| Terceira                        | 3.06 | 60.6 $\pm$ 1.3                           | 7.6 $\pm$ 0.3   | 0.24 $\pm$ 0.09   | 0.32 $\pm$ 0.07 |
| Terceira                        | 3.2  | 89.8 $\pm$ 1.4                           | 12.2 $\pm$ 0.1  | 0.12 $\pm$ 0.07   | 0.21 $\pm$ 0.02 |
| Terceira                        | 3.3  | 113.66 $\pm$ 1.9                         | 7.7 $\pm$ 1.2   | 0.22 $\pm$ 0.01   | 0.16 $\pm$ 0.07 |
| Pico<br>(Madalena)              | 3.27 | 110.4 $\pm$ 1.1                          | 10.0 $\pm$ 0.1  | 0.32 $\pm$ 0.35   | IA*             |
| Trás-os-Montes<br>(Vinhais)     | 4.1  | 196.9 $\pm$ 0.7                          | 43.9 $\pm$ 0.3  | 0.02 $\pm$ 0.01   | IA*             |
| Caramulo<br>(Serra do Caramulo) | 4.2  | 355.7 $\pm$ 2.3                          | 35.8 $\pm$ 0.3  | 0.11 $\pm$ 0.19   | IA*             |
| Alentejo<br>(Mértola)           | 3.58 | 52.8 $\pm$ 1.9                           | 5.4 $\pm$ 0.7   | IA*   | 0.25 $\pm$ 0.11 |
| Algarve<br>(Serras do Algarve)  | 3.71 | 99.3 $\pm$ 5.4                           | 10.0 $\pm$ 0.1  | 0.13 $\pm$ 0.07   | 0.11 $\pm$ 0.01 |

\* Inibição ausente - Não se observou um efeito inibidor do escurecimento enzimático.

Os méis de origem açoriana tendem a apresentar valores mais baixos de pH (entre 3.1 e 3.6), enquanto que méis da região Norte de Portugal apresentam os valores mais elevados (4.1 e 4.2). É esta última região que apresenta os méis com um valor mais elevado de fenóis totais (Caramulo: 355.7 mg GAE/100g) e actividade antioxidante (Trás-os-Montes:  $43.9 \times 10^{-4}$   $\mu$ eq/mg). Em contrapartida, é também em Portugal continental (Alentejo) que aparece o mel com menor quantidade total de fenóis (52.8 mg GAE/100g) e reduzida actividade antioxidante ( $5.4 \times 10^{-4}$   $\mu$ eq/mg). Observou-se assim, uma variação muito elevada entre os méis de diferentes origens geográficas, quer na quantidade total de fenóis (52.8 a 355.7 mg GAE/100g), quer na actividade antioxidante ( $5.4 \times 10^{-4}$  a  $43.9 \times 10^{-4}$   $\mu$ eq/mg).

Como se pode observar na figura 1, obteve-se uma correlação elevada ( $r=0,837$ ) entre o conteúdo em fenóis dos méis e as respectivas actividades antioxidantes (gráfico A). Ao eliminarmos um ponto do gráfico, correspondendo ao mel com actividade antioxidante mais elevada (proveniente de Trás-os-Montes), obtivemos uma forte correlação ( $r=0,937$ ), demonstrando a contribuição extremamente relevante dos compostos fenólicos na actividade antioxidante destes méis. Os resultados sugerem ainda que a elevada actividade antioxidante apresentada pelo mel de Trás-os-Montes será apenas parcialmente devida ao conteúdo em fenóis, e existirá outro factor responsável por um acréscimo na actividade antioxidante. Embora outros autores<sup>6,9</sup> tenham igualmente observado fortes correlações entre a capacidade antioxidante de certos méis e o seu conteúdo em fenóis, estes últimos não serão os únicos componentes do mel responsáveis pela actividade antioxidante. Gheldof *et al.* (2002)<sup>9</sup> sugerem que a capacidade antioxidante do mel pode resultar da combinação de uma grande variedade de compostos, incluindo fenóis, péptidos, ácidos orgânicos e enzimas.

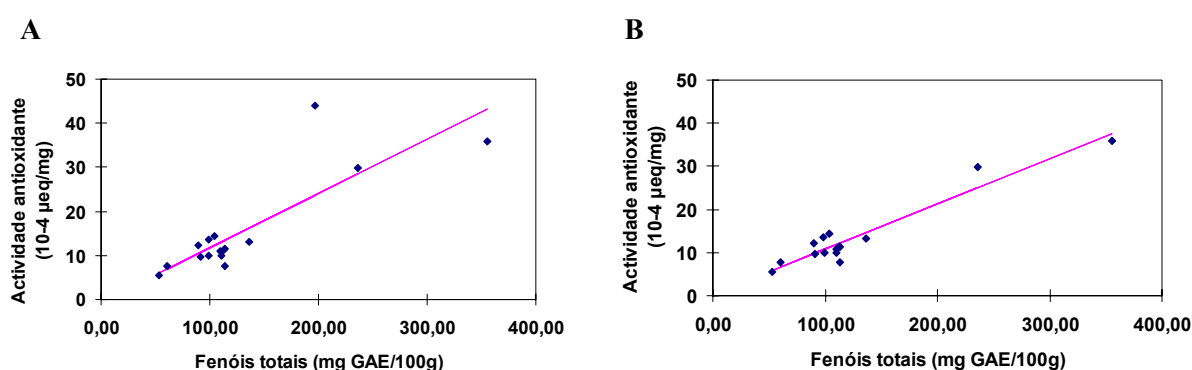


Figura 1 – Correlação entre o teor total de fenóis e a actividade antioxidante das amostras de mel. **A:** gráfico com todas as amostras de mel ( $n=16$ ,  $r=0,837$ ); **B:** gráfico onde foi eliminada a amostra com actividade antioxidante mais elevada, correspondente ao mel de Trás-os-Montes ( $n=15$ ,  $r=0,937$ ).

Observou-se ainda uma correlação moderada ( $r=0,729$ ) entre os valores de pH e a actividade antioxidante dos méis (figura 2, gráfico A). Assim, méis mais ácidos (grupo onde se incluem os méis açorianos) tendem a possuir menor actividade antioxidante. Contudo, uma amostra de São Miguel (Ribeira Grande), embora apresente um pH baixo (3.4), possui uma actividade antioxidante elevada ( $\sim 30 \times 10^{-4}$  µeq/mg). Curiosamente, esta amostra não apresenta qualquer actividade inibidora do escurecimento enzimático em ambos os frutos estudados (quadro 1). Inclui-se assim na tendência observada de uma relação inversa entre a concentração de fenóis e a capacidade em inibir o escurecimento enzimático ( $r=-0,589$ ; figura 2, gráfico B).

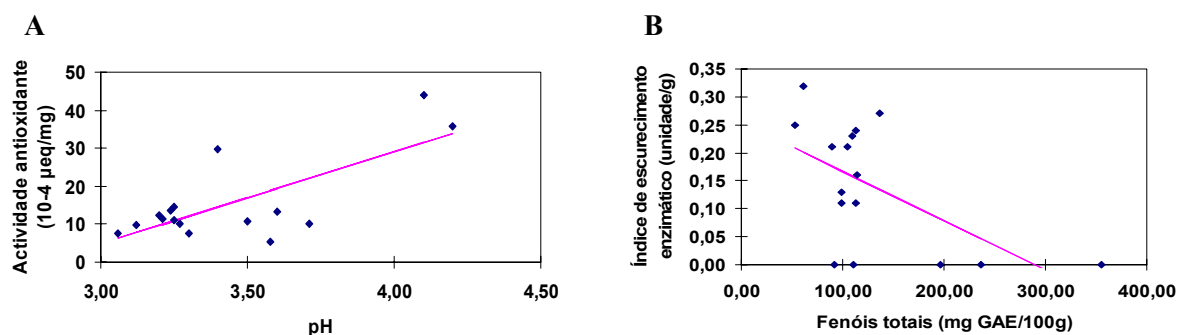


Figura 2 – Gráfico **A:** Correlação entre o pH e actividade antioxidante do mel ( $n=16$ ,  $r=0,729$ ); Gráfico **B:** Correlação entre os fenóis totais e o escurecimento enzimático da pêra ( $n=16$ ,  $r=-0,589$ ).

De um modo geral, os méis testados não foram muito eficazes em inibir o escurecimento enzimático da polpa de banana e pêra rocha (quadro 1), quando comparados com os índices de escurecimento enzimático apresentados pelo bissulfito de sódio ( $0.79 \pm 0.18$  unidade/g na banana e  $0.94 \pm 0.03$  unidade/g na pêra). Observaram-se também grandes variações no índice de escurecimento enzimático entre os méis de diferentes proveniências. Uma das amostras provenientes de São Miguel apresentou um índice de inibição do escurecimento enzimático ( $0.54$  unidade/g banana) mais próximo dos valores obtidos pelo bissulfito de sódio. Pelo contrário, as amostras provenientes do continente português apresentaram valores muito baixos de inibição do escurecimento enzimático em ambos os frutos. Esta observação é corroborada pelas correlações negativas observadas entre o pH dos méis e a respectiva inibição do escurecimento da banana ( $r = -0,410$ ) e pêra ( $r = -0,362$ ; figura 3). É possível que o efeito do pH seja devido à presença de ácidos orgânicos nos méis (e.g. ácido ascórbico), que funcionam como inibidores da polifenoloxidase. Apresentando os méis açorianos valores mais baixos de pH, serão assim mais eficazes na inibição do escurecimento enzimático. Este trabalho vem assim demonstrar que alguns méis portugueses têm potencialidades para serem utilizados como aditivos alimentares com propriedades antioxidantes, e/ou como inibidores do escurecimento enzimático em frutos.

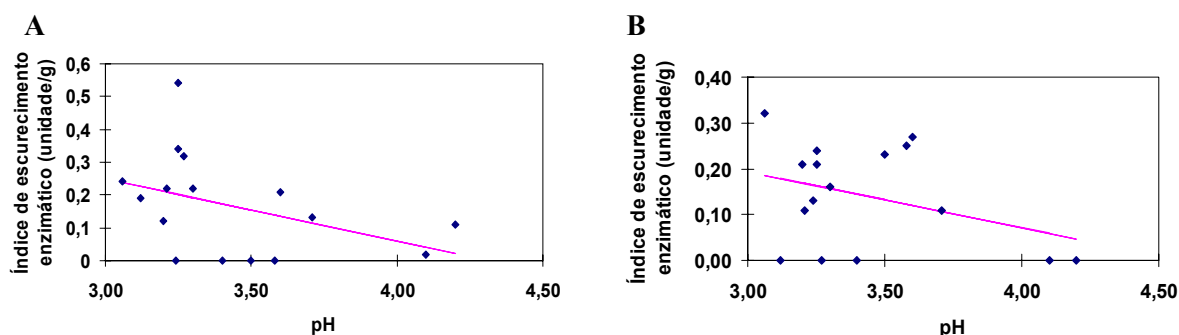


Figura 3 – Gráfico **A**: Correlação entre o pH o índice de escurecimento enzimático da polpa da banana ( $n=16$ ,  $r=-0,410$ ); Gráfico **B**: Correlação entre o pH e o índice de escurecimento enzimático da polpa da pêra rocha ( $n=16$ ,  $r=-0,362$ ).

## Referências

- [1] – D.V. Parke, D.F.V. Lewis - Food Additives and Contaminants **9** (1992) 561
- [2] – R.S. Lanigan, T.A. Yamarik - Int. J. Toxicol. **21** (2002) 19
- [3] – G. Miliauskas, P.R. Venskutonis, T.A. van Beek - Food Chem. **85** (2004) 231
- [4] – S. Iqbal, M.I. Bhangar - Food Chem. **100** (2007) 246
- [5] – V. Baltrusaityte, P.R. Venskutonis, V. Ceksteryte - Food Chem. **101** (2007) 502
- [6] – A.M. Aljadi, M. Y. Kamaruddin Food Chem. - **85** (2004) 513
- [7] – T. Nagai, R. Inoue, N. Kanamori, N. Suzuki, T. Nagashima - Food Chem. **97** (2006) 256
- [8] – S. Antony, J.R. Rieck, J.C. Acton, I.Y. Han, E.L. Halpin, P.L. Dawson - Poultry Science **85** (2006) 1811
- [9] – N. Gheldof, X.H. Wang, N.J. Engeseth, - J. Agric.Food Chem. **50** (2002) 5870
- [10] – L. Chen, A. Mehta, M. Berenbaum, A.R. Zanger, N.J. Engeseth, - J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 4997
- [11] – R. C. Soliva-Fortuny, O. Martin-Belloso - Trends in Food Science Technology **14** (2003) 341
- [12] – M. Jeon, Y. Zhao - Int. J. Food Sci. Nutrition **56** (2005) 165
- [13] – P. Andrade, F. Ferreres, M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán - Food Chem. **60** (1997) 79
- [14] – T. Bahorun, A. Luximon-Ramma, A. Crozier, O.I. Aruoma - J.Sci.Food Agric **84** (2004) 1553



## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC/UV METHOD FOR QUANTIFICATION OF BIOACTIVE PEPTIDES IN FERMENTED MILKS

*Ferreira<sup>1</sup>, I.M.P.L.V.O.; Pinho<sup>1,2</sup>, O.; Eça<sup>1</sup>, R.; Tavares<sup>3</sup>, P.; Pereira<sup>3</sup>, A.; Roque<sup>1</sup>, A.C.*

<sup>1</sup>REQUIMTE- Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4099-030 Porto; Portugal

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>3</sup>REQUIMTE - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa 2829-516 Caparica, Portugal

During the past decade, many bioactive peptides derived from milk proteins were characterized. These bioactive peptides are latent in the primary sequences of proteins and may be released in the course of gastro-intestinal-like proteolysis and food processing such as milk fermentation. A few hydrolysates of milk proteins were reported the most potent to exert an antihypertensive effect in vivo. In fermented milk products, peptide activities depend on type of bacterial starter cultures and degree of proteolysis. The use of *L. Helveticus* bacteria increases the production of praline-containing short peptides, such as Iso-Pro-Pro (IPP) and Val-Pro-Pro (VPP). These IPP and VPP peptides derived from casein hydrolysis are known to have an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity. ACE has a role in regulation blood pressure by converting angiotensin I (Ang I) to angiotensin II (Ang II), which contracts the blood vessels. ACE inhibitory peptides can also be formed by hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin, the most potent reported to date is Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR).

Commercial fermented milks with antihypertensive effect can be obtained by action of *L. Helveticus* bacteria or by the addition of bioactive peptides obtained through a patented process. These fermented milks have different degrees of protein hydrolysis. A HPLC methodology with UV detection for separation and quantification of IPP, VPP, ALPMHIR, casein,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in fermented milks was developed. Calibration curves were constructed in the interval of 0.1-1 mg/ml for peptides and 0.1-2 mg/ml for proteins.  $R^2$  invariably exceeded 0.99. In fermented milk samples IPP, VPP and ALPMHIR were identified by comparison with standards, peak purity was evaluated after fractions collection and sequencing by automated Edman degradation. Good precision and accuracy was obtained.

## **DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM UVA, POLPA DE UVA E SUCO CONCENTRADO DE UVA POR HPLC**

*\* Godoy, H.T.; Scherer, R.; Rybka, A.C.P.; Prado, M.A.*

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. [\\*helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)

O objetivo desse trabalho foi avaliar o teor dos ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico presentes na uva, na polpa e no suco concentrado. A determinação foi realizada por CLAE utilizando coluna C18 e fase móvel tamponada ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01M, pH=2,59) a vazão de 0,5 mL/min e detecção a 210 e 250nm. Foram avaliados 3 lotes diferentes de cada matriz composta por 3 unidades por lote, para fruta, cada unidade equivale a um cacho de uva. As amostras foram diluídas, filtradas e injetadas no cromatógrafo, no caso da uva e polpa, foram previamente trituradas em liquidificador. A recuperação, feita em dois níveis de concentração, ficou entre 89 e 100%. Os limites de detecção e quantificação e coeficientes de linearidade ( $r^2$ ) foram respectivamente: tartárico: 0,7 e 1,2,  $r^2=1,0$ ; málico: 3,3 e 5,6,  $r^2=1,0$ ; ascórbico: 0,03 e 0,05,  $r^2=0,9998$  e cítrico: 1,9 e 3,1  $\mu\text{g/mL}$ ,  $r^2=0,9995$ . A repetibilidade e precisão intermediária foram realizadas em dois níveis ( $n=10$ ) e o coeficiente de variação (CV) variou entre 0,4-2,3% considerando todas as análises. Não foi encontrado ácido ascórbico em nenhuma das amostras. Na uva, o ácido em maior quantidade foi o tartárico (148,5 mg/100g) seguido pelo málico (84,3 mg/100g) e cítrico (3,0 mg/100g). No suco concentrado foram encontrados os valores de 190,9; 165,4 e 6,3 mg/100mL, para ácido tartárico, málico e cítrico, respectivamente. Na polpa não foi encontrado ácido cítrico, entretanto, os valores encontrados para os ácidos tartárico e málico foram de 230,6 e 74,1 mg/100g, respectivamente. A diferença dos valores encontrados para uva, suco e polpa pode ser atribuída a diferentes variedades de uva. O método se mostrou rápido, simples, gerou pouco resíduo e não tóxico (água), além disso, apresentou boa precisão e exatidão. A uva apresenta elevados teores de ácido tartárico, que talvez pudesse ser utilizado como parâmetro de qualidade de sucos de uva.

# AVALIAÇÃO DE ESTERÓIS E DE ESTANÓIS VEGETAIS EM LEITES E IOGURTES E SUA IMPORTÂNCIA NA REDUÇÃO DA COLESTEROLÉMIA

Saraiva<sup>1</sup>, D.; Castilho<sup>2</sup>, M.C.; Martins<sup>1</sup>, M. R.; Ramos<sup>\*2</sup>, F. e Noronha da Silveira<sup>2</sup>, M.I.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade de Évora  
Rua Romão Ramalho, 59  
7000-671 Évora

<sup>2</sup>Grupo de Bromatologia do CEF – Centro de Estudos Farmacêuticos da Universidade de Coimbra,  
Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra  
3000-295 Coimbra

\* Telefone: +351.239859994 Fax: +351.239827126 email: [fjramos@ci.uc.pt](mailto:fjramos@ci.uc.pt)

**Palavras-chave:** colesterol, fitoesteróis, fitoestanóis, leite, iogurte, GC-MS

**Resumo:** Uma alimentação desadequada conduz, frequentemente, ao aparecimento de doenças cardiovasculares com consequências relevantes ao nível da saúde da população, sendo importante salientar a responsabilidade destas doenças como causa *major* de morte na Europa. O desenvolvimento prematuro deste tipo de doenças encontra-se claramente associado a níveis elevados de colesterol no plasma. Nos últimos anos, constatou-se que os fitoesteróis e os fitoestanóis tinham a capacidade de baixar os níveis da colesterolémia, devido ao facto daqueles compostos apresentarem uma estrutura semelhante ao colesterol. O processo de competição que se estabelece a nível intestinal traduz-se numa diminuição da absorção do colesterol, contribuindo, desta forma, para reduzir o aparecimento de doenças cardiovasculares. O estudo que se apresenta tem como objectivo avaliar a quantidade de esteróis e de estanóis vegetais presentes em leites e iogurtes. Os fitoesteróis e os fitoestanóis foram extraídos com n-hexano, após um processo de saponificação com potassa alcoólica. O extracto foi evaporado à secura, procedendo-se, depois, à derivatização do resíduo seco com BSTFA. A identificação e a quantificação dos esteróis e dos estanóis vegetais foram efectuadas por GC-MS com recurso ao método do padrão interno, no caso colestanol. Os alimentos lácteos disponíveis no mercado português que apresentam como alegações nutricionais a redução do colesterol (duas marcas de leite e cinco de iogurte) foram analisados, tendo sido possível observar que as amostras de leite continham tanto fitoesteróis como fitoestanóis. No que se refere a fitoesteróis, o  $\beta$ -sitosterol e o campesterol foram encontrados sempre em maior quantidade relativamente ao brassicasterol e ao estigmasterol, enquanto que, no caso dos fitoestanóis, o estigmastanol aparece em concentração mais elevada que o campestanol. No que se refere aos iogurtes, verificou-se que uma das marcas utiliza apenas fitoestanóis, enquanto que as outras, apresentam os mesmos esteróis e estanóis que o leite e, também, na mesma proporção relativa, ainda que em maior quantidade.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitoesteróis são constituintes naturais das plantas que se assemelham estruturalmente ao colesterol animal. Os mais comuns apresentam na sua molécula um anel de ciclopentano-perhidrofenantreno, com um grupo OH na posição  $3\beta$  e uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6, idêntico ao do colesterol. Porém, enquanto a cadeia lateral do colesterol é constituída por 8 átomos de carbono, a maioria dos fitoesteróis são caracterizados por um ou dois carbonos extra ligados a C-24. Já os estanóis vegetais diferem dos fitoesteróis por possuírem modificações no anel, no qual a dupla ligação sofreu uma redução  $5\alpha$ .

Todos os alimentos vegetais contêm quantidades apreciáveis de fitoesteróis mas, actualmente, essas quantidades ainda não vêm especificadas na maioria dos alimentos, o que impossibilita determinar quantitativamente o consumo diário de fitoesteróis numa dieta. Contudo, estima-se que o consumo diário de fitoesteróis esteja compreendido entre os 150-400mg/dia dos quais 65% corresponde a  $\beta$ -sitosterol, 30% a campesterol e 5% a estigmasterol [1].

O crescente interesse no consumo de fitoesteróis resulta da conclusão de inúmeros estudos que admite que a ingestão diária destes compostos é eficaz na diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol LDL, cujos níveis elevados são um factor de risco das doenças cardiovasculares (DCV), a principal causa de morte nas civilizações ocidentais [1]. A deposição de colesterol e outros lípidos na parede das artérias provoca o seu espessamento o que dificulta, ou mesmo bloqueia, a circulação do sangue. O risco de aterosclerose aumenta com o aumento dos níveis de colesterol-LDL e diminui com o aumento dos níveis de colesterol-HDL. Os níveis sanguíneos de colesterol-LDL são, de facto, um bom indicador estatístico do potencial risco de um enfarte agudo do miocárdio. Assim, nos dias de hoje, a diminuição dos níveis de colesterol é um dos principais alvos na prevenção das DCV, razão pela qual cada vez mais compostos naturais como os fitoesteróis e os fitoestanóis têm vindo a ser adicionados a alimentos como leite e iogurtes que são o objecto do presente estudo.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Padrões e Reagentes**

Os padrões utilizados, colesterol, brassicasterol, campesterol, campestanol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, estigmastanol e colestano, padrão interno, foram adquiridos à Sigma (Madrid, Espanha). Os reagentes usados na saponificação, extracção e derivatização, foram o hidróxido de potássio, etanol absoluto e n-hexano (Merck, Darmstad, Alemanha), água para cromatografia obtida por um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA) e bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Supelco, Sintra, Portugal).

### **2.2. Gases**

Os gases utilizados, azoto N45 e hélio N55, foram fornecidos pela Sogafer (Coimbra, Portugal).

### **2.3. Material**

Para a realização das diferentes etapas do método analítico, foi utilizado banho de ultrassons (Bandelin, Sonorex RK 100, Berlim, Alemanha), vortex e bloco de aquecimento com sistema de evaporação de azoto (Reagente 5, Porto, Portugal), sistema cromatográfico da Agilent Technologies (AT) adquirido à Soquímica (Lisboa, Portugal) controlado por computador Hewlett Packard Compaq e composto por injector automático AT 7683B, cromatógrafo gás-líquido AT 6890N, com coluna AT-5MS (30m  $\times$  0,25mm i.d.  $\times$  0,25 $\mu$ m de espessura), acoplado a um detector de massa AT 5975

### **2.4. Preparação dos padrões**

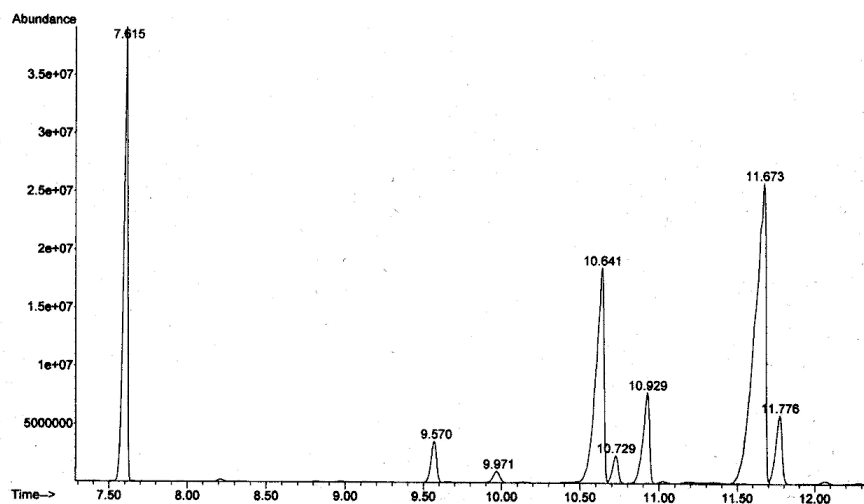
As soluções stock foram preparadas em etanol, através da dissolução e homogeneização em ultrassons de quantidade adequada de padrão, na concentração de 2 mg/ml. A partir das soluções stock, preparou-se uma solução de trabalho com concentração de 80 $\mu$ g/ml, também em etanol. A solução de trabalho do padrão interno, colestano, foi preparada na concentração de 50 $\mu$ g/ml. Todas as soluções foram conservadas no frigorífico entre 2 e 8  $^{\circ}$ C.

## 2.5. Preparação das amostras

As embalagens originais foram convenientemente homogeneizadas, tendo-se retirado 5 ml de cada amostra, iogurte e leite, para tubos de ensaio. No caso das amostras de leite, partiu-se de 250 µl e de 100 µl no caso de iogurtes, a que se adicionaram 50 µl de padrão interno e solução de KOH em etanol a 90%, 2M/1,5 ml e 2,5M/2,5 ml, enquanto a etapa de saponificação foi efectuada a 80°C/45 min. e 60°C/90 min., respectivamente para leites e iogurtes. Após saponificação, procedeu-se à extracção da fracção insaponificável, com 1 ml de n-hexano. Transferiram-se, então, 250 µl da solução de n-hexano para o interior de um “vial” de derivatização que se evaporaram à secura sob corrente de azoto a 60°C. O resíduo seco foi derivatizado com 50 µl de BSTFA: TMCS (99:1), a 60°C durante 30 minutos [2].

## 2.6. Cromatografia

A determinação dos fitoesteróis e dos fitoestanóis foi efectuada através de injeção, em modo splitless, 1 minuto, de 2,0 µl da amostra derivatizada, a uma temperatura de 250°C. Como fase móvel, utilizou-se o hélio, com um fluxo constante de 1,0 ml/min.. A temperatura inicial da coluna, 200°C, foi mantida durante 1 minuto, após o que aumentou a 20°C/min até atingir a temperatura de 300°C, que foi mantida durante 10 minutos. O detector encontrava-se a uma temperatura de 280°C e a recolha de dados foi efectuada em modo SCAN por ionização em impacto electrónico. Os resultados foram avaliados através da comparação dos rácios obtidos entre as áreas dos picos de fitoesteróis e de fitoestanóis e do padrão interno de cada cromatograma. Na figura 1 pode ser observado um cromatograma tipo dos padrões estudados.



**Figura 1** – Cromatograma de padrões (7,615-colestano; 9,570-colesterol; 9,971- brassicasterol; 10,641-campesterol; 10,729-campestanol; 10,929-estigmasterol; 11,673-β-sitosterol; 11,776-estigmastanol)

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fitoesteróis e os fitoestanóis, devido à sua natureza lipofílica, foram, inicialmente, adicionados a alimentos ricos em gordura, como margarinas. No entanto, como a quantidade de gordura a ingerir não deve fornecer mais de 30% do total de energia, este tipo de produtos cedo evidenciou não ser a melhor escolha para uma alimentação saudável. Por este motivo, nos últimos anos fizeram-se estudos para avaliar a eficácia dos esteróis e estanóis vegetais quando incorporados em alimentos com baixo teor de gordura, como os iogurtes e o leite, que

demonstraram que para além de se tratar de alimentos que facilmente se integram numa dieta saudável, a sua eficácia é igual à dos produtos ricos em gordura [3].

A maior parte dos estudos que comparam a actividade dos esteróis vegetais e dos estanois, concluem que a sua capacidade para reduzir o colesterol é igual, embora alguns considerem que os últimos são mais eficazes, sendo necessário uma menor quantidade para se obter o mesmo efeito [4]. Esta eficácia superior estará relacionada com o facto dos estanois apresentarem uma absorção praticamente nula, permanecendo durante mais tempo no lúmen intestinal, onde interferirão continuamente e de forma mais eficaz com a absorção do colesterol [3].

Foram analisados os alimentos lácteos disponíveis no mercado português que apresentavam como alegações nutricionais a redução do colesterol (duas marcas de leite e cinco de iogurte), tendo sido possível observar que as amostras de leite continham tanto fitoesteróis (brassicasterol, campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol) como fitoestanois (campestanol e estigmastanol). No que se refere a fitoesteróis, o  $\beta$ -sitosterol e o campesterol foram encontrados sempre em maior quantidade relativamente ao brassicasterol e ao estigmasterol, o que pode estar relacionado com o facto de serem os mais eficazes na redução dos níveis séricos de colesterol total e das LDL [5] e, também, com o facto de serem os mais abundantes na natureza e consequentemente os que já são ingeridos em maior quantidade numa dieta normal. Quanto a fitoestanois, foi observado que o estigmastanol, provavelmente também devido ao facto de ser mais abundante na natureza, aparece em concentração mais elevada que o campestanol. No que se refere aos iogurtes, verificou-se que uma das marcas utilizava apenas os fitoestanois já referidos, enquanto que as outras, apresentavam os mesmos compostos mencionados para o leite e, também, na proporção relativa já descrita, ainda que em maior quantidade.

Como conclusão, e de uma forma geral, importa relevar que as concentrações encontradas nos leites estão de acordo com as porções de ingestão diária recomendadas internacionalmente para redução da colesterolémia. Quanto aos iogurtes analisados, e apesar de, genericamente, se poder retirar conclusão idêntica à que foi referida para os leites, importa equacionar as quantidades individuais de cada embalagem, bem como a soma total dos fitoesteróis e de fitoestanois existentes em cada uma, para se poder definir a quantidade de iogurte a ingerir de forma a conseguir os propósitos desejados sendo que, em regra, uma embalagem por dia será suficiente para a obtenção dos efeitos pretendidos.

Finalmente, e apesar dos estudos até agora realizados serem suficientes para encorajar a utilização de fitoesteróis e de fitoestanois em pessoas com altos níveis de colesterol e com risco elevado de DCV, há necessidade de prosseguir os estudos, principalmente sobre o impacto destes compostos na saúde, após longos períodos de utilização.

#### 4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Estudos Farmacêuticos da Fundação para a Ciência e Tecnologia (CEF-FCT) e à ANF – Associação Nacional das Farmácias, o financiamento do estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] – G.S.M.J.E. et al.-Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plants sterols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 171-185
- [2] – R. Santos et al-Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chem.* 102 (2007) 113-117.
- [3] – T.U.T. Nguyen-The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J. Nutrit.* 129 (1999) 2109-2112.
- [4] – K.B. Hicks et al-Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. *Food Technol.* 50 (2001) 63-67.
- [5] – A. Jong et al-Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J. Nutrit. Biochem.* 14 (2003) 362-369.

# CHÁ VERDE COMO ALIMENTO FUNCIONAL – ESTUDOS DOS DIFERENTES COMPOSTOS FENÓLICOS E A SUA ESTABILIDADE

Rodrigues <sup>a</sup>, V.; Castilho <sup>a</sup>, M.C.; Ramos <sup>a</sup>, F.; Campos <sup>b</sup>, M.G.; Silveira <sup>a</sup>, M.I.N.

<sup>a</sup> Laboratório de Bromatologia e <sup>b</sup> Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Rua do Norte 3000-295, Coimbra, Portugal

## 1. Introdução

O chá, uma das bebidas mais consumidas no mundo, logo a seguir à água [1,2] é a infusão de folhas ou botões da planta *Camellia sinensis*, geralmente preparada com água quente. Todas as variedades de chá provêm dos rebentos jovens desta planta. As diferenças derivam do clima, do período da colheita e do tratamento a que são submetidos posteriormente. Cada variedade adquire um sabor definido de acordo com o processamento utilizado, que pode incluir oxidação, fermentação e o contacto com outras ervas, especiarias e frutos. Assim, podemos classificar o chá em quatro tipos: 1) Chá branco que representa a menor forma de processamento da planta *Camellia sinensis*; 2) Chá verde, ou chá não fermentado que se caracteriza pela inactivação da enzima *polifenol oxidase* imediatamente a seguir à colheita dos gomos do chá [3]; 3) Chá oolong, um chá semi-fermentado; 4) Chá preto, em que durante a fermentação, os enzimas presentes nas folhas do chá conduzem à transformação dos flavonóides em teorrubiginas (47%) e teoflavinas (13%), o que confere a cor avermelhada e o sabor adstringente ao chá. Estudos recentes evidenciam os efeitos benéficos do chá, bebida funcional, para a saúde dos consumidores, incluindo a redução do colesterol, da tensão arterial, os efeitos antioxidantes, antimicrobianos, a protecção contra o cancro [4] e contra doenças cardiovasculares [1,4,5]. Estes efeitos salutares são atribuídos principalmente aos compostos fenólicos, os antioxidantes do chá [6].

O objectivo deste estudo foi separar, identificar e quantificar simultaneamente e no menor tempo possível o ácido gálgico (principal ácido fenólico presente no chá), a cafeína e as seis catequinas, (-) Epigalocatequina galhato (EGCG), (-) –Epigalocatequina (EGC), (-) –Epicatequina galhato (ECG), (-) –Epicatequina (EC), (-) –Galhocatequina(GC) e (+) –Catequina (C) existentes em nove variedades de chá verde adquiridas em lojas locais. Com este trabalho, pretende-se ainda comparar a relação polifenóis/cafeína à temperatura recomendada na embalagem e a 85°C/10 minutos, entre os diferentes chás verde e inferir sobre a estabilidade dos oito compostos que nos propomos analisar, 24 horas após a sua preparação.

## 2. Metodologia

Neste trabalho foram utilizadas nove amostras de chá verde mais consumidos em Portugal - Bio 3 (B3), Tuo Tea (TT), Tè Verde Biológico (TV), Double Dragon (DD), Gorreana (G), Sir Winston Tea (SW), Diese (D), Tetley (T) e Lipton (L), adquiridas em lojas locais na cidade de Coimbra. Para as infusões utilizaram-se 200mL de água (aquecida) a duas temperaturas e a dois tempos de extracção: 1) - temperatura e tempo de extracção recomendados em cada uma das embalagens\*; (85°C/10 minutos, temperatura e 2) tempo seleccionados após um estudo com o *chá verde Gorreana*, preparado a várias temperaturas (70°C, 85°C e 100°C) e a vários tempos de extracção (3, 5 e 10 minutos). Os infusos foram filtrados através de um filtro de 0,45µm antes da análise por HPLC/UV.

\* Nota: na embalagem de chá verde Gorreana não vinha especificada a que temperatura e tempo se deveria realizar a infusão, tendo sido escolhida a relação mais recomendada nos chás analisados, 100°C/ 3 minutos.

A quantificação dos polifenóis do chá verde e da cafeína, foi efectuada por HPLC-UV. Este sistema consiste numa bomba *modelo 321*, num injector *Rheodyne, modelo 4301*, com um loop fixo de 100 µl e um detector ultravioleta, *modelo 155*, fixado a um comprimento de onda de 210 nm. Foi usada uma coluna C<sub>18</sub> Hichrom 5 µm (300 x 4.0 mm i.d.) equipada com uma pré-coluna C<sub>18</sub> Nucleosil (5 x 2.0 mm i.d). O forno da coluna foi regulado para 35°C. A fase móvel adoptada foi acetonitrilo / água acidulada com ácido ortofosfórico a pH 2.5 (15:85, (v/v)) e a velocidade de fluxo foi de 1.5 ml/min. Os picos cromatográficos nas amostras foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de referência (Sigma).

### 3. Resultados e discussão

#### *Validação da metodologia*

A relação entre a concentração e a área do pico está demonstrada, na tabela 1 pelo intervalo de linearidade e o valor do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) da equação. Todos os analitos evidenciaram boa linearidade ( $r$ ) no intervalo testado com valores de coeficiente de regressão linear entre 0.988 e 0.999. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do AG, GC, EGC, CAF, EC+ECG e EGCG encontram-se na tabela 2. A percentagem de recuperação no chá verde Gorreana varia de 43,8% a 121% para os três níveis de fortificação adaptados para cada um dos componentes analisados consoante o teor dos mesmos que normalmente existem nos chás verde. (Tabela 3). Para os três níveis escolhidos, a % de recuperação varia entre 58,2% e 87,0% para o AG, 66,0% a 79,6% para a GC, 57,7% a 70,6% para a CAF, 43,8% a 107,3% para EC+ECG e entre 57,0% a 121,1%. O desvio padrão oscila entre 2,50 e 23,46.



Tabela 1. Estudo de linearidade do AG, CAF e catequinas por HPLC-UV

|               | <b>Intervalo de linearidade (mg/L)</b> | <b>R<sup>2</sup></b> |
|---------------|--|----------------------|
| <b>AG</b>     | 15 – 50                                | 0,999                |
| <b>GC</b>     | 15-50                                  | 0,994                |
| <b>EGC</b>    | 125 – 500                              | 0,989                |
| <b>CAF</b>    | 100 – 250                              | 0,993                |
| <b>EC+ECG</b> | 30 – 150                               | 0,997                |
| <b>EGCG</b>   | 50 – 300                               | 0,988                |

Tabela 2. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do AG, CAF e catequinas por HPLC-UV.

|               | <b>LD (mg/L)</b> | <b>LQ (mg/L)</b> |
|---------------|------------------|------------------|
| <b>AG</b>     | 4,66             | 15,52            |
| <b>GC</b>     | 2,46             | 8,21             |
| <b>EGC</b>    | 2,80             | 9,33             |
| <b>CAF</b>    | 5,93             | 19,77            |
| <b>EC+ECG</b> | 1,18             | 3,94             |
| <b>EGCG</b>   | 2,31             | 7,69             |

Tabela 3. Percentagem de recuperação do AG, GC, CAF, EC+ECG e EGCG no chá verde Gorreana.

| <b>Padrões</b> | <b>Níveis de Fortificação (mg/L)</b> | <b>%Recuperação (% ± SD)</b> |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>AG</b>      | 30                                   | 58,2 ± 2,50                  |
|                | 50                                   | 87,0 ± 23,46                 |
| <b>GC</b>      | 15                                   | 66,0 ± 12,74                 |
|                | 30                                   | 67,4 ± 5,41                  |
|                | 50                                   | 79,6 ± 5,13                  |
| <b>CAF</b>     | 50                                   | 60,4 ± 7,43                  |
|                | 200                                  | 57,7 ± 5,73                  |
|                | 300                                  | 70,6 ± 14,76                 |
| <b>EC+ECG</b>  | 100                                  | 43,8 ± 10,12                 |
|                | 200                                  | 107,3 ± 11,43                |
| <b>EGCG</b>    | 50                                   | 57,0 ± 6,80                  |
|                | 200                                  | 110,1 ± 12,04                |
|                | 300                                  | 121,1 ± 2,52                 |

### ***Determinação quantitativa das diferentes amostras de chá verde***

Foram verificadas diferentes variações de peso entre as 20 saquetas de cada um dos chás analisados, pelo que se optou a apresentação dos resultados em “mg” de compostos fenólicos ou cafeína “/grama” de saqueta, e não por saqueta individualizada. O *chá verde Gorreana* é o que apresenta maior variação de peso das saquetas sendo o valor mínimo encontrado 1,73g e o máximo 3,19g.

Os teores dos polifenóis e da cafeína nos chás analisados são apresentados nas Tabelas 4 e 5. Na Tabela 6 encontram-se o teor de polifenóis totais e a relação polifenóis/cafeína das nove amostras de chá verde a duas temperaturas e tempos de extracção.

Relativamente à temperatura e tempo de extracção recomendados na embalagem de cada chá verde, os *chás Tuo Tea* (TT), *Tè Verde Biológico* (TV), *Double Dragon* (DD), *Diese* (D) e *Lipton* (L), preparados a 85°C durante 10 minutos apresentam teores superiores de cafeína e de polifenóis, sendo a relação polifenóis/cafeína semelhante no caso do chá TT, superior para os chás DD, D e L e inferior para o TV. Analisando a variação dos polifenóis individualmente, pode-se afirmar que no caso destes cinco chás verde, todos aumentam. Destaca-se o aumento significativo da EGCG e EC+EGC nos chás TT e TV, da EGC e EGCG nos chás DD e D. Os *chás verde Gorreana* (G) e *Tetley* (T) quando preparados a 85°C/10 min têm menos cafeína e menos polifenóis, sendo a relação polifenóis/cafeína semelhante às duas temperaturas, embora ligeiramente inferior no chá G e ligeiramente superior no chá T. Nestes dois casos os teores de todos os polifenóis diminuem, com excepção da EGC que se mantém constante no chá G.

É indiferente preparar o *chá verde Bio 3* (B3) a 100°C/3 min ou a 85°C/10 min, uma vez que, quer o teor de cafeína, como o de polifenóis, no seu conjunto e individualmente, quer ainda a relação polifenóis/cafeína se mantém constantes. O chá com maior teor de polifenóis e com relação polifenóis/catequinas superior é o chá verde *Tè Verde Biológico*. O chá com menos cafeína, polifenóis e relação polifenóis/cafeína é o DD. O chá verde Bio 3 é o que apresenta mais cafeína. Os polifenóis presentes em maior concentração nos chás analisados são a EGC, seguida da EGCG e EC+EGC.

### ***Ensaio de Estabilidade***

Com o estudo de estabilidade realizado com o chá verde *Gorreana*, em que após a preparação, o chá foi armazenado em embalagens de plástico transparente e âmbar à temperatura ambiente e no frigorífico durante 24 horas pode-se afirmar que o efeito da luz e da temperatura não interfere significativamente com a concentração dos compostos analisados. A diferença mais relevante verifica-se com a estabilidade da EGC e da EGCG que fica comprometida quando a solução onde se encontram está acondicionada numa garrafa âmbar à temperatura ambiente e não numa transparente ou qualquer uma destas no frigorífico

## **4. Conclusões**

A eluição isocrática desenvolvida, permite a determinação rápida (10 minutos) e simultânea das catequinas, ácido gálico e da cafeína no chá verde. As catequinas presentes em maior concentração nos chás analisados são a EGC e EGCG. Todas as amostras contêm cafeína. Deste estudo, realça-se o facto de, exceptuando o *chá verde Sir Winston Tea*, não haver uma relação aparente entre a possibilidade de se obter um infuso com menor conteúdo em cafeína e maior em polifenóis que seja significativo, usando apenas como premissas a relação temperatura-tempo de extracção, uma vez que, ao diminuir o teor de cafeína diminui também o teor de polifenóis.

Concluiu-se ainda que os 8 compostos analisados são estáveis, não se verificando uma diferença significativa dos mesmos quando armazenados em embalagens de plástico transparente e âmbar à temperatura ambiente ou no frigorífico.

*Como aqui foi realçado, os resultados das investigações, actualmente disponíveis, apontam para a existência de uma contribuição positiva da ingestão de chá para uma vida saudável. No entanto, a comunidade científica encontra-se ainda nas fases iniciais da investigação sobre este assunto. É importante ter em consideração que não existe ainda nenhuma prova da existência de uma relação directa entre o consumo de chá e a prevenção da Doença. No entanto, sugerem vários estudos que serão necessários mais estudos para determinar os efeitos protectores do chá, assim como, a possibilidade de um limite máximo, após o qual o chá já não é benéfico.*

#### **Referências bibliográficas:**

- [1] Cheng, Tsung. (2006). All teas are not created equal. The Chinese green tea and cardiovascular health. *International Journal of Cardiology* 108, 301-308.
- [2] Labbé, D., Tremblay, A., & Bazinet, L. (2006). Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: Basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. *Separation and Purification Technology* 49, 1-9.
- [3] Sharma, V., Gulati, A., & Ravindranath, S.D. (2005). Extrability of tea catechins as a function of manufacture procedure and temperature of infusion. *Food Chemistry*, 93, 141-148.
- [4] Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acid in green, Oolong, black and pur-erh teas using HPLC with a photodiode array. *Talanta*, vol. 57, 307-316.
- [5] Tijburg, L. (2000). Flavonoides du thé et maladies cardio-vasculaires. *Revue de la littérature. Cah. Nutr. Diét* 35, supplément I.
- [6] Nishitani, E., & Sagesaka, Y. (2004). Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis* 17, 675-685.

**polifenóis e cafeína (em mg/g  $\pm$  desvio padrão) nas amostras de chá verde à temperatura e tempo de extração recomendada na embalagem.**

| Chá verde(N=3)   | AG             | GC              | EGC             | C               | CAF             | EC+ECG          | EGCG            | Polifenóis Totais |
|------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| B3<br>(100°C 3') | 2,2 $\pm$ 0,16 | 5,2 $\pm$ 0,46  | 49,3 $\pm$ 0,01 | 1,1 $\pm$ 0,003 | 28,0 $\pm$ 0,03 | 8,2 $\pm$ 0,04  | 39,6 $\pm$ 0,90 | 106 $\pm$ 0,26    |
| TT<br>(100°C 5') | 3,6 $\pm$ 0,01 | 5,1 $\pm$ 0,01  | 31,2 $\pm$ 1,14 | 4,3 $\pm$ 0,20  | 23,7 $\pm$ 0,42 | 20,6 $\pm$ 0,52 | 28,9 $\pm$ 0,11 | 94 $\pm$ 0,33     |
| TV<br>(85°C 3')  | 2,5 $\pm$ 0,11 | 7,1 $\pm$ 0,32  | 72,9 $\pm$ 1,31 | 1,6 $\pm$ 0,28  | 19,0 $\pm$ 0,56 | 8,2 $\pm$ 1,78  | 49,7 $\pm$ 0,61 | 142 $\pm$ 0,74    |
| DD<br>(100°C 2') | 0,4 $\pm$ 0,01 | 1,1 $\pm$ 0,12  | 6,5 $\pm$ 0,37  | 0,2 $\pm$ 0,01  | 4,4 $\pm$ 0,04  | 1,4 $\pm$ 0,01  | 5,2 $\pm$ 0,14  | 15 $\pm$ 0,11     |
| G<br>(100°C 3')  | 2,3 $\pm$ 0,03 | 6,4 $\pm$ 0,07  | 36,3 $\pm$ 0,46 | 1,5 $\pm$ 0,04  | 14,1 $\pm$ 0,26 | 8,0 $\pm$ 0,12  | 15,8 $\pm$ 0,11 | 70 $\pm$ 0,14     |
| SW<br>(100°C 5') | 2,2 $\pm$ 0,05 | 5,8 $\pm$ 0,22  | 52,0 $\pm$ 0,64 | 1,0 $\pm$ 0,11  | 25,4 $\pm$ 0,25 | 5,0 $\pm$ 0,03  | 0,5 $\pm$ 0,01  | 67 $\pm$ 0,18     |
| D<br>(100°C 3')  | 1,5 $\pm$ 0,04 | 3,9 $\pm$ 0,14  | 41,7 $\pm$ 0,70 | 0,6 $\pm$ 0,05  | 17,0 $\pm$ 0,42 | 3,2 $\pm$ 0,08  | 6,5 $\pm$ 0,49  | 57 $\pm$ 0,25     |
| T<br>(100°C 5')  | 2,7 $\pm$ 0,08 | 6,5 $\pm$ 0,06  | 53,9 $\pm$ 0,29 | 2,0 $\pm$ 0,08  | 26,0 $\pm$ 0,50 | 9,5 $\pm$ 2,28  | 39,2 $\pm$ 1,16 | 114 $\pm$ 0,66    |
| L<br>(100°C 3')  | 3,7 $\pm$ 0,30 | 10,8 $\pm$ 1,42 | 45,2 $\pm$ 0,98 | 3,4 $\pm$ 0,27  | 24,5 $\pm$ 1,17 | 12,1 $\pm$ 0,81 | 36,2 $\pm$ 1,04 | 111 $\pm$ 0,80    |

**Tabela 5. Teor de polifenóis e cafeína (em mg/g ± desvio padrão) nas amostras de chá verde a 85°C 10 minutos.**

| Chá verde<br>(N=3) | AG         | GC         | EGC         | C          | CAF         | EC+ECG      | EGCG        | Polifenóis<br>Totais |
|--------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| B3                 | 2,2 ± 0,08 | 5,0 ± 0,12 | 49,7 ± 1,14 | 0,9 ± 0,04 | 28,4 ± 0,64 | 8,3 ± 0,34  | 41,1 ± 0,27 | 107 ± 0,33           |
| TT                 | 4,3 ± 0,18 | 5,8 ± 0,40 | 35,4 ± 1,05 | 5,0 ± 0,37 | 27,0 ± 1,01 | 24,7 ± 0,42 | 32,2 ± 0,17 | 107 ± 0,43           |
| TV                 | 3,2 ± 0,01 | 9,6 ± 0,08 | 83,4 ± 1,00 | 2,2 ± 0,15 | 24,5 ± 0,84 | 12,2 ± 2,79 | 58,4 ± 0,08 | 169 ± 0,69           |
| DD                 | 1,1 ± 0,03 | 2,0 ± 0,11 | 20,6 ± 4,45 | 0,4 ± 0,04 | 9,4 ± 0,41  | 3,2 ± 0,02  | 15,3 ± 0,11 | 43 ± 0,79            |
| G                  | 1,8 ± 0,04 | 4,9 ± 0,13 | 36,3 ± 0,23 | 1,0 ± 0,08 | 11,5 ± 0,23 | 6,2 ± 0,20  | 10,7 ± 0,31 | 61 ± 0,17            |
| SW                 | 2,1 ± 0,28 | 4,9 ± 0,77 | 50,0 ± 2,14 | 0,8 ± 0,20 | 24,9 ± 1,75 | 6,2 ± 2,07  | 39,6 ± 0,53 | 104 ± 1,00           |

**Tabela 6. Relação polifenóis/cafeína nas nove amostras de chá verde à temperatura e tempo recomendados (TR) em cada embalagem e a 85°C/10minutos.**

| Chá verde<br>(N=3) | Polifenóis Totais<br>(mg/g ± DP)<br>TR | Polifenóis Totais<br>(mg/g ± DP)<br>85°C/10' | Relação<br>polifenóis/cafeína<br>TR | Relação<br>polifenóis/cafeína<br>85°C/10' |
|--------------------|--|--|-------------------------------------|---|
| B3                 | 106 ± 0,26                             | 107 ± 0,33                                   | 3,78                                | 3,77                                      |
| TT                 | 94 ± 0,33                              | 107 ± 0,43                                   | 3,97                                | 3,96                                      |
| TV                 | 142 ± 0,74                             | 169 ± 0,69                                   | 7,49                                | 6,91                                      |
| DD                 | 15 ± 0,11                              | 43 ± 0,79                                    | 3,40                                | 4,56                                      |
| G                  | 70 ± 0,14                              | 51 ± 0,16                                    | 4,96                                | 4,44                                      |
| SW                 | 66 ± 0,18                              | 104 ± 1,00                                   | 2,60                                | 4,19                                      |
| D                  | 57 ± 0,25                              | 79 ± 0,22                                    | 3,36                                | 3,45                                      |
| T                  | 114 ± 0,66                             | 97 ± 0,20                                    | 4,39                                | 4,64                                      |
| L                  | 111 ± 0,80                             | 127 ± 0,36                                   | 4,53                                | 4,71                                      |



# PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACÁRIDOS DE DIFERENTES MATERIAIS RICOS EM XILANOS: AVALIAÇÃO DA SUA CAPACIDADE PREBIÓTICA

Moura, P., Carvalheiro, F., Marques, S., Alves, L., Gírio, F.M., Esteves\*, M. P..

INETI, Departamento de Biotecnologia, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa  
Tel +351-210924600 Fax +351-217163636 e-mail: paula.esteves@ineti.pt

**Palavras-chave:** sub-produtos vegetais, auto-hidrólise, xilo-oligossacáridos, prebióticos

## Resumo:

Neste trabalho é descrita a produção de hidrolisados ricos em xilo-oligossacáridos (XOS), utilizando a auto-hidrólise como método de fraccionamento selectivo das hemiceluloses de diferentes materiais ricos em xilanos: dreche cervejeira, carolo de milho e eucalipto. Os hidrolisados e os resíduos sólidos resultantes do tratamento foram caracterizados quimicamente e, para cada material, foram estabelecidas as condições operacionais que permitem obter os rendimentos em XOS mais elevados. Os hidrolisados ricos em XOS obtidos nas condições optimizadas foram purificados por cromatografia de filtração em gel (GFC) preparativa e seleccionadas fracções que foram caracterizadas quanto ao grau de polimerização (DP), concentração de oligo- e monossacáridos, ácido acético e produtos de decomposição dos açúcares. A capacidade de utilização *in vitro* dos XOS por culturas puras de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, assim como por culturas mistas intestinais, foi avaliada com várias misturas de XOS de diferentes DP. Para tal, foram quantificados os consumos dos XOS e os produtos de fermentação (ácidos gordos de cadeia curta e ácido láctico) e determinadas as curvas de crescimento ao longo do período de fermentação. A capacidade de os XOS modularem a microflora intestinal foi estudada *in vivo*, com hidrolisados brutos de carolo de milho desidratados (com cerca de 60% de XOS), incorporados em dietas para leitões na fase de pós-desmame.

## 1. INTRODUÇÃO

Os xilo-oligossacáridos (XOS) têm sido referidos como prebióticos emergentes que apresentam as mesmas ou melhores propriedades do que prebióticos já estabelecidos, como os fruto-

-oligossacáridos (FOS). Os XOS comerciais são produzidos por tratamento enzimático de materiais ricos em xilano, sendo essencialmente constituídos por xilobiose e xilotriose. Uma alternativa económica e ambientalmente interessante para a obtenção de XOS com características diversas consiste no fraccionamento selectivo dos materiais por processos hidrotérmicos, como é o caso da auto-hidrólise.

O efeito prebiótico define-se como o aumento, induzido pela dieta, do número e/ou actividade de, predominantemente, bifidobactérias ou bactérias lácticas no intestino grosso do homem [1]. Por isso, os membros dos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os alvos preferenciais em estudos que visam a avaliação do potencial prebiótico de novos ingredientes alimentares. Em termos de microflora intestinal, pretende-se uma proliferação selectiva destes géneros microbianos, que se consideram benéficos para a saúde do hospedeiro. Constituem também objectivo da intervenção prebiótica a estimulação da produção de determinados metabolitos de fermentação, como é o caso do butirato que actua de forma benéfica ao nível do epitélio intestinal, e o prolongar da capacidade de persistência de novos oligossacáridos (OS) ao longo do tracto intestinal, de modo a garantir uma fermentação mais sacarolítica até zonas distais do intestino grosso.

Com o objectivo de propor uma metodologia sequencial para a produção de novos *OS* e a avaliação do seu potencial prebiótico, são apresentados neste trabalho, a título de exemplo, resultados obtidos com *XOS* produzidos por auto-hidrólise a partir de subprodutos vegetais. A metodologia proposta encontra-se estruturada em duas etapas: uma de produção de *XOS* com novas características, diferentes dos *OS* comerciais, e outra de avaliação do efeito prebiótico que inclui ensaios de fermentação e incorporação de *XOS* em dietas animais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Produção e purificação de xilo-oligosacáridos

Os materiais ricos em xilanos (dreche cervejeira, carolo de milho e eucalipto) foram sujeitos a tratamentos hidrotérmicos em reactores de aço-inox (Parr Instruments Co., EUA). Os ensaios efectuaram-se em condições isotérmicas ou não-isotérmicas, com temperaturas a variar entre 150°C e 225°C [2], [3] e [4]. A severidade dos tratamentos foi descrita utilizando o factor de severidade,  $\log R_0$  [5], que agrupa num parâmetro o efeito da temperatura e do tempo da reacção:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T(t)-100}{14,75}\right).dt \quad (1)$$

Terminada a reacção, os hidrolisados e os sólidos e foram separados por filtração e caracterizados conforme descrito abaixo. A purificação dos hidrolisados e o fraccionamento dos *OS* por massa molar aparente foi efectuada por GFC em condições já descritas [3].

### Ensaio de fermentação

Os ensaios de fermentação *in vitro*, com estirpes puras ou com culturas mistas intestinais, realizaram-se em condições de anóxia em meio basal modificado [6] com a incorporação de uma quantidade conhecida de cada fonte de *OS* em estudo. O crescimento bacteriano foi monitorizado por medição da D.O. a 600 nm e/ou quantificaram-se os consumos de *XOS* e a produção de ácidos gordos de cadeia curta e ácido láctico [3].

Os ensaio de fermentação *in vivo* foram realizados com 4 grupos de 6 leitões em fase de pós-desmame que, durante 4 semanas, foram alimentados com uma dieta basal (BD), com BD suplementada com *XOS* (BD+*XOS*), com BD suplementada com um probiótico comercial (BD+SC) ou com BD suplementada com *XOS* e probiótico comercial (BD+*XOS*+SC). Seis leitões em fase de amamentação foram utilizados como referência para o tempo inicial ( $t_0$ ). A modulação da microflora do íleo, ceco e cólon distal, por efeito da dieta, foi avaliada por determinação dos títulos de PCR utilizando iniciadores específicos e por ERIC-PCR [7].

### Metodologia analítica

As matérias-primas e os resíduos sólidos resultantes dos tratamentos hidrotérmicos foram caracterizados após hidrólise ácida quantitativa (HAQ) com  $H_2SO_4$  [8]. O resíduo insolúvel em ácido foi considerado como lenhina Klason e os monossacáridos e ácido acético foram quantificados por HPLC, como descrito em baixo para os hidrolisados.

Os hidrolisados contendo *XOS* foram caracterizados por HPLC como previamente descrito [2]. Os *OS* foram quantificados indirectamente após HAQ e expressos como aumento de monossacáridos após a hidrólise referida.

Os *XOS* separados por massa molar aparente foram caracterizados por cromatografia de exclusão molecular (HPSEC) e por HPLC após HAQ. A gama de DP de fracções de interesse foi estimada por HPLC, contra padrões externos de *XOS* (Megazyme Int., Irlanda) [3].



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Produção de xilo-oligossacáridos

##### Fase 1: Caracterização dos materiais de origem

A composição química dos hidrolisados e dos XOS obtidos depende dos materiais de origem, assim como das condições operacionais de extracção e/ou fraccionamento das hemiceluloses. Na Tabela 1 apresenta-se a composição das três matérias-primas estudadas. Apesar de todas se tratarem de materiais ricos em xilanos, apresentam algumas diferenças na composição das hemiceluloses. Além disso, o carolo de milho é o material mais rico em polissacáridos e com menor teor de lenhina.

**Tabela 1 – Composição química dos materiais (g/100g matéria seca)**

|                |             | Dreche<br>cervejeira | Carolo<br>de milho | Eucalipto |
|----------------|-------------|----------------------|--------------------|-----------|
| Hemicelulose   | Xilano      | 20,6                 | 33,0               | 20,1      |
|                | Arabinano   | 9,02                 | 5,72               | < 0,5     |
|                | Gr. Acetilo | 1,07                 | 5,55               | 4,54      |
| Glucano        |             | 21,9                 | 38,4               | 45,4      |
| Lenhina Klason |             | 21,7                 | 12,3               | 21,1      |

##### Fase 2: Optimização da produção de XOS e caracterização dos hidrolisados

Os tratamentos hidrotérmicos permitem a hidrólise selectiva das hemiceluloses, conduzindo à obtenção de (arabino)xilo-oligosacáridos (XOS) como produto principal. Para os três materiais foram optimizadas as condições operacionais da auto-hidrólise que permitem a obtenção dos rendimentos máximos em XOS e os resultados obtidos relacionados com o factor de severidade ( $\log R_\theta$ ), até valores de 4,25.

**Tabela 2 – Composição dos hidrolisados liofilizados obtidos nas condições de recuperação máxima de xilo-oligosacáridos para cada material (g/100 g matéria seca)**

|               | Dreche cervejeira | Carolo de milho | Eucalipto |
|---------------|-------------------|-----------------|-----------|
| XOS           | 40,3              | 55,3            | 50,0      |
| GOS           | 14,5              | 5,11            | 3,54      |
| AcO           | 1,07              | 5,11            | 10,6      |
| Xilose        | 5,23              | 3,44            | 7,99      |
| Glucose       | 2,91              | 1,63            | 2,06      |
| Arabinose     | 9,28              | 4,67            | 3,67      |
| Ácido acético | 2,30              | 0,96            | 2,81      |
| Furfural      | 1,49              | 0,27            | 0,58      |
| HMF           | 0,22              | 0,01            | 1,1       |

XOS, xilo-oligosacáridos substituídos com arabinose; GOS, gluco-oligosacáridos; AcO, grupos *O*-acetilo; HMF, hidroximetilfurfural

Na Tabela 2 é apresentada a composição dos hidrolisados para as recuperações de XOS mais elevadas: para a dreche cervejeira e eucalipto foram obtidas para a temperatura de 190°C e um tempo de reacção isotérmico de 5 min ( $\log R_\theta=3,73$ ); para o carolo do milho, foram obtidos para a temperatura de 208°C ( $\log R_\theta=3,75$ , operação não-isotérmica). Os licores resultantes da auto-hidrólise do carolo de milho apresentam a percentagem de XOS mais elevada, superior em 27% e 9,7% aos obtidos a partir de dreche e eucalipto, respectivamente. Os XOS obtidos a partir do eucalipto são os mais acetilados e com o menor grau de substituição com unidades de arabinose. Uma situação inversa verifica-se para os XOS provenientes de dreche cervejeira. As percentagens totais de monossacáridos identificados variam entre 9,7 e 17,4 e as concentrações de outros subprodutos da hidrólise, *e.g.*, ácido acético, HFM e furfural, são sempre relativamente baixas.

### Fase 3: Fraccionamento de XOS por DP

Os hidrolisados obtidos nas condições otimizadas para cada material foram purificados por GFC e as fracções de interesse caracterizadas quanto ao DP dos XOS. Apresenta-se na Tabela 3, como exemplo, a composição relativa (DP 2-6) dos XOS comerciais e de duas fracções purificadas provenientes dos hidrolisados de carolo de milho.

Os XOS comerciais são maioritariamente de baixo DP (>50% de DP 2), enquanto os processos de fraccionamento e purificação utilizados neste trabalho permitiram obter XOS com diferente distribuição de DP.

**Tabela 3 – Composição dos XOS comerciais e de fracções provenientes da purificação de hidrolisados de carolo de milho (% relativa).**

|       | XOS comerciais | XOS CM1 | XOS CM2 |
|-------|----------------|---------|---------|
| DP 2  | 54             | 13      | 5       |
| DP 3  | 29             | 28      | 19      |
| DP 4  | 17             | 23      | 21      |
| DP 5  | -              | 17      | 23      |
| DP 6  | -              | 15      | 22      |
| >DP 6 | -              | 4       | 10      |

CM1 e CM2, fracções purificadas provenientes da auto-hidrólise de carolo de milho

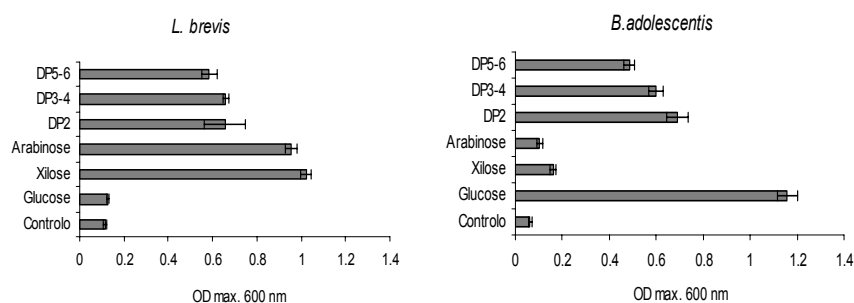
### 3.2. Avaliação da capacidade prebiótica

Com base no conhecimento acumulado e em bibliografia relevante, propõe-se, para a avaliação da capacidade prebiótica de novos OS, a seguinte metodologia:

#### Fase 1: Utilização comparativa de OS, *in vitro*, por bactérias probióticas

Avaliação da capacidade dos OS em estudo para suportar especificamente o crescimento das estirpes probióticas seleccionadas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), em condições de anóxia.

a) Determinação das D.O. máximas em meios de cultura contendo OS como fonte de carbono e energia, por comparação com controlo e monossacáridos.



**Figura 1 – Densidades ópticas máximas em XOS**

b) Acompanhamento da cinética da fermentação, para determinação de taxas específicas de crescimento, determinação do consumo de OS e monitorização do pH, produção de gás e de metabolitos ao longo da fermentação por estirpes probióticas.

Os XOS produzidos por auto-hidrólise de carolo de milho, com DP 3-4, possuem uma capacidade bifidogénica semelhante à de XOS comerciais.

**Tabela 4 – Consumo de XOS por *B. adolescentis* e *L. brevis* durante a fermentação**

| Estirpe                | XOS    | Consumo (%)    |                |
|------------------------|--------|----------------|----------------|
|                        |        | $\Delta t_1^a$ | $\Delta t_2^a$ |
| <i>B. adolescentis</i> | DP 2   | 51,6 ± 1,2     | ND             |
|                        | DP 3-4 | 52,9 ± 1,9     | ND             |
|                        | DP 5-6 | 34, ± 1,8      | ND             |
| <i>L. brevis</i>       | DP 2   | ND             | 38,3 ± 2,2     |
|                        | DP 3-4 | ND             | 31,4 ± 3,5     |
|                        | DP 5-6 | 1,7 ± 1,8      | 24,8 ± 2,7     |

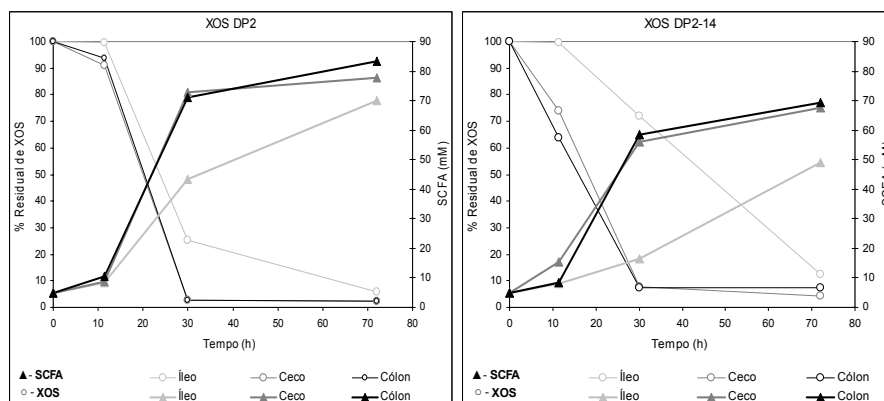
<sup>a</sup>  $\Delta t_1$  e  $\Delta t_2$  correspondem, respectivamente, aos intervalos de tempo de 0 – 11,5 h e 11,5 – 30,0 h; ND, não detectado

c) Para avaliação da capacidade de novos OS poderem constituir um substrato selectivo para bactérias consideradas benéficas ao nível intestinal, é importante a realização de ensaios de fermentação com estirpes não probióticas de origem intestinal.

## Fase 2: Utilização comparativa de OS, *in vitro*, por microfloras intestinais

Determinação dos consumos de OS e dos metabolitos da fermentação produzidos.

Os XOS produzidos por auto-hidrólise de carolo de milho, com DP2-14, são mais dificilmente degradados pela microflora do íleo do que os XOS comerciais.



**Figura 2 – Consumo de XOS e produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) em fermentações com conteúdos do íleo, ceco e cólon de um leitão**

## Fase 3: Avaliação da modulação da microflora intestinal, *in vitro*, em ensaios de fermentação e *in vivo*, por efeito da inclusão de OS em dietas

a) As alterações na microflora intestinal são monitorizadas com recurso a técnicas microbiológicas clássicas, mas devem ser complementadas com métodos de monitorização molecular, para detectar alterações em grupos bacterianos específicos da microflora intestinal.

Em ensaios *in vivo*, observou-se um efeito prebiótico potencial ao nível da população de lactobacilos do cólon em leitões que receberam dietas com inclusão de XOS.

**Tabela 5 – Frequência (%) de leitões com título de PCR positivo, utilizando iniciadores específicos de grupo para *Lactobacillus e Pediococcus***

| DNA (ng)         | t <sub>0</sub> <sup>(1)</sup> | BD <sup>(2)</sup> | BD+XOS <sup>(2)</sup> | BD+SC <sup>(2)</sup> | BD+XOS+SC <sup>(2)</sup> | χ <sup>2</sup> | P <sup>(3)</sup> |
|------------------|-------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|----------------|------------------|
| Cólon            |                               |                   |                       |                      |                          |                |                  |
| 10 <sup>0</sup>  | 100                           | 100               | 100                   | 100                  | 100                      | 0              | 1,0000           |
| 10 <sup>-1</sup> | 100                           | 100               | 100                   | 100                  | 100                      | 0              | 1,0000           |
| 10 <sup>-2</sup> | 100                           | 66,7              | 100                   | 66,7                 | 83,3                     | 4,8000         | 0,3084           |
| 10 <sup>-3</sup> | 16,7                          | 0                 | 16,7                  | 0                    | 33,3                     | 4,0385         | 0,4008           |

<sup>(1)</sup> Leitões sacrificados em fase de desmame; <sup>(2)</sup> Leitões sacrificados que receberam dietas suplementadas; <sup>(3)</sup> Probabilidade de significância de χ<sup>2</sup>.

b) Além da detecção específica, a utilização de técnicas de “fingerprinting”, como por exemplo de ERIC-PCR, permitiram a caracterização de perfis de alterações na microflora intestinal, induzidas pela incorporação de novos OS em dietas humanas e/ou animais [7]

#### **Fase 4: Determinação do Índice Prebiótico (PI)**

Para a comparação do potencial prebiótico entre diferentes OS, é possível determinar o valor de PI, com recurso a sondas moleculares para contagens de *Bifibobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Clostridium* utilizando a técnica FISH (hibridação com fluorescência *in situ*) e a realização de contagens totais por DAPI, em fermentações com conteúdos intestinais humanos[9].

#### **Referências**

- [1] J. Van Loo, J. Cummings, N. Delzenne, H. Englyst, A. Franck, M. Hopkins, N. Kok, G. Macfarlane, D. Newton, M. Quiley, M. Roberfroid, T. van Vliet, E. van den Heuvel, (1999) – British J. Nutr., **81**, 121–132.
- [2] F. Carvalheiro, M.P. Esteves, J.C. Parajó, H. Pereira, F.M. Gírio (2004) – Bioresource Technol., **91**: 93-100
- [3] P. Moura, R. Barata, F. Carvalheiro, F. Gírio, M.C. Loureiro-Dias, M.P. Esteves (2007) – LWT-Food Sci. Technol. (in press)
- [4] Gírio, F.M., Carvalheiro, F., Esteves, M.P., Amaral Collaço, M.T., Parajó, J.C., Domínguez, H., Alonso, J.L., Vázquez, M.J., Garrote, G., Koukios, E.G., Avgerinos, E.S., Voragen, A.G.J., Schols, H.A, Kabel, M.A. (2003). Patente portuguesa nº 102.563
- [5] R.P. Overend, E. Chornet (1990). Canadian J. Phys., **68**: 1105-1111
- [6] J. Jaskari, P. Kontula, A. Siitonen, H. Jousimies-Somer, T. Mattila-Sandholm, K. Poutanen (1998). Appl. Microbiol. Biotechnol., **49**, 175-181.
- [7] P. Moura, S. Marques, L. Alves, J.P.B. Freire, L. F. Cunha, M.P. Esteves (2006) – Livest. Sci. (in press)
- [8] Browning, B.L., (1967). In: Sarkeanen, K.V., Ludwig, C.H. (Eds.), *Methods of Wood Chemistry*, vol. 2. John Wiley & Sons, New York, pp. 795-798
- [9] R.J. Palframan, G.R. Gibson, R.A. Rastall (2003) – Curr. Issues Intest. Microbiol., **4**, 71-75.

# ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Lactarius piperatus* EM DIFERENTES FASES DE MATURAÇÃO

*Barros, L.; Baptista, P. e Ferreira, I.C.F.R. \**

CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança  
Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal  
Tel +351-273 303219 Fax +351-273 325 405 e-mail: iferreira@ipb.pt

**Palavras-chave:** Cogumelo silvestre; Antioxidantes; Actividade antioxidante; Fase de maturação

Resumo: Neste trabalho, avaliou-se o efeito do estado de maturação do corpo frutificante de um cogumelo silvestre, *Lactarius piperatus*, na sua actividade antioxidante e produção de antioxidantes. Realizaram-se vários testes bioquímicos para determinar as propriedades antioxidantes: poder redutor, capacidade bloqueadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), inibição da hemólise de eritrócios mediada por radicais peróxido e inibição da peroxidação lipídica pelo método do  $\beta$ -caroteno-linoleato. Foram também determinadas as quantidades de fenóis, flavonóides, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno presentes em corpos frutificantes imaturos, maduros e degradados. O estado maduro, mas ainda com esporos imaturos foi aquele em que foram encontrados mais antioxidantes e valores de EC<sub>50</sub> mais baixos para a actividade antioxidante.

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais com actividade antioxidante podem ser úteis no auxílio do sistema endógeno protector contra a produção de radicais livres, podendo ser utilizados como nutracêuticos. Nessa perspectiva, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores que ajudem a corpo humano na redução dos danos oxidativos. Nos últimos anos, têm aparecido vários antioxidantes naturais isolados de diferentes partes das plantas, tais como, sementes oleaginosas, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas. Os cogumelos, em particular, produzem vários metabolitos secundários, incluindo compostos fenólicos, poliquétidos, terpenos e esteróides. A qualidade do nutracêutico depende da composição química do corpo frutificante, sobretudo no que concerne ao teor em fenóis e flavonóides. Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de componentes não essenciais da nossa dieta associados à inibição da aterosclerose e cancro [1]. Os flavonóides também demonstraram várias acções bioquímicas e farmacológicas, nomeadamente actividade antimicrobiana, antitrombótica, antimutagénica e anticarcinogénica [2].

Alguns estudos apresentados pelo nosso grupo [3,4] e por outros autores [5-12] descrevem uma correlação entre a actividade antioxidante de cogumelos e o seu conteúdo em fenóis. No entanto, nenhum dos estudos que descreve a composição dos cogumelos em antioxidantes e/ou a sua actividade antioxidante refere o estado de desenvolvimento dos carpóforos. Mais, nenhum dos estudos teve como objectivo avaliar a actividade antioxidante em diferentes fases de desenvolvimento dos carpóforos, para uma potencial aplicação na preparação de nutracêuticos.

Neste trabalho, avaliou-se a produção de antioxidantes e a actividade antioxidante do basidiomiceta, *L. piperatus*, em quatro fases de maturação do carpóforo. A actividade antioxidante foi avaliada através do efeito bloqueador em radicais livres de DPPH, do poder

reductor, da inibição da hemólise em eritrócitos induzida por AAPH (di-hidroclorato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) e da inibição da peroxidação lipídica pelo sistema  $\beta$ -caroteno-linoleato. Estes ensaios têm sido exaustivamente utilizados como modelos de avaliação dos danos provocados pela peroxidação de biomembranas. Os valores obtidos foram correlacionados com os conteúdos em compostos fenólicos, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Selecção dos carpóforos e preparação das amostras

*Lactarius piperatus* (L.) Pers. foram colhidos num Carvalho (*Quercus pyrenaica*) de Bragança (Nordeste de Portugal), na Primavera de 2006. Foram seleccionados vários carpóforos em diferentes estados de maturação: imaturos (chapéu fechado; Fase I), maduros (chapéu aberto) com esporos imaturos (Fase II), maduros com esporos maduros (Fase III) e degradados (Fase IV). Após liofilização e trituração dos carpóforos (~5g de cada amostra), procederam-se a três extracções sucessivas de 24 h em metanol.

### 2.2. Determinação de componentes antioxidantes

Os fenóis totais foram determinados na presença do reagente de Folin e Ciocalteu's, fazendo ligeiras alterações ao procedimento descrito por Singleton & Rossi [13]. O ácido gálico foi usado para obter a curva-padrão (0,01-0,4 mM).

Os flavonóides foram determinados pelo método descrito por Jia *et al.* [14], tendo-se usado (+)-catequina para obter a curva-padrão (0,022-0,34 mM).

O ácido ascórbico foi obtido usando 2,6-dicloroindofenol, de acordo com o método de Klein & Perry [15]. O ácido L-ascórbico puro foi usado para obter a curva-padrão (0,020-0,12 mg/ml).

O  $\beta$ -caroteno e o licopeno foram determinados de acordo com o método descrito por Nagata & Yamashita [16] e aplicando a fórmula Licopeno (mg/100ml) =  $-0.0458A_{663} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$ ;  $\beta$ -caroteno (mg/100ml) =  $0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$ .

### 2.3. Ensaio de avaliação da actividade antioxidante

O efeito bloqueador das amostras em radicais livres de DPPH foi avaliado de acordo com o método de Hatano *et al.* [17]. Determinou-se o efeito medindo o decréscimo da absorvância a 517 nm, devido à redução do radical DPPH (Actividade bloqueadora de radicais (%)) =  $[(A_{DPPH} - A_E) / A_{DPPH}] \times 100$ ;  $A_E$  - absorvância da solução após a adição do extracto;  $A_{DPPH}$  - absorvância da solução de DPPH. Foram usados como padrões o BHA (2-*tert*-butil-4-metoxifenol) e o  $\alpha$ -tocoferol.

O poder reductor das amostras foi determinado de acordo com o método de Oyaizu [18]. O poder reductor foi avaliado medindo a absorvância a 700 nm, após mistura das amostras com compostos férricos; uma absorvância alta indica um elevado poder reductor. Foram usados como padrões o BHA e o  $\alpha$ -tocoferol.

A inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peroxilo foi avaliada de acordo com o método de Miki *et al.* [19]. Determinou-se o efeito protector dos extractos de cogumelos na hemólise de eritrócitos induzida por AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) e calculando a % inibição hemólise =  $[(A_{AAPH} - A_E) / A_{AAPH}] \times 100$ , onde  $A_E$  é a absorvância da amostra contendo o extracto metanólico de cogumelo e  $A_{AAPH}$  é a absorvância do controlo que não contém extracto metanólico. Foi usado como padrão o ácido L-ascórbico.

A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno determinou-se usando o sistema  $\beta$ -caroteno-linoleato [20]. A inibição da peroxidação lipídica (descoloração do  $\beta$ -caroteno na presença de ácido linoleico foi determinada espectrofotometricamente a 470 nm e calculada através da equação: actividade antioxidante = ( $\beta$ -caroteno após 2h de ensaio/  $\beta$ -caroteno inicial) x 100. Foi usado como padrão o TBHQ (*tert*-butil-hidroquinona).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 apresentam-se as concentrações de fenóis totais, flavonóides, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e licopeno presentes em extractos metanólicos de *L. piperatus* em diferentes fases de maturação. Verificou-se que os fenóis são os compostos antioxidantes encontrados em maior quantidade, que o ácido ascórbico é pouco abundante (0,03–0,16 mg/g) e que o  $\beta$ -caroteno e licopeno só existem em quantidades vestigiais (<34 $\mu$ g/g). As fases em que o carpóforo apresenta esporos imaturos (fases I e II) revelaram uma concentração elevada de fenóis e flavonóides. A quantidade encontrada na fase III (com esporos maduros) e na fase IV (degradado) decresceu significativamente ( $p < 0.05$ ) em relação aos teores obtidos na primeira fase. Provavelmente, a maturação provoca a formação de espécies reactivas de oxigénio, que são neutralizadas por compostos fenólicos, resultando na diminuição dos mesmos pela sua capacidade antioxidante.

**Tabela 1.** Componentes antioxidantes (média  $\pm$  s) presentes em *Lactarius piperatus* em diferentes fases de maturação. Em cada linha, letras diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

|                                | Fase I             | Fase II            | Fase III           | Fase IV            |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Fenóis (mg/g)                  | 5,52 $\pm$ 0,14 b  | 5,76 $\pm$ 0,09 a  | 3,09 $\pm$ 0,12 c  | 2,03 $\pm$ 0,11 d  |
| Flavonóides (mg/g)             | 1,26 $\pm$ 0,09 b  | 1,58 $\pm$ 0,02 a  | 0,35 $\pm$ 0,03 c  | 0,19 $\pm$ 0,01 d  |
| Ác. ascórbico (mg/g)           | 0,15 $\pm$ 0,01 a  | 0,16 $\pm$ 0,01 a  | 0,13 $\pm$ 0,01 b  | 0,03 $\pm$ 0,01 c  |
| $\beta$ -caroteno ( $\mu$ g/g) | 26,08 $\pm$ 0,05 b | 33,78 $\pm$ 0,05 a | 17,22 $\pm$ 0,00 c | 15,11 $\pm$ 0,02 d |
| Licopeno ( $\mu$ g/g)          | 8,14 $\pm$ 0,03 b  | 13,04 $\pm$ 0,02 a | 5,80 $\pm$ 0,01 c  | 5,41 $\pm$ 0,01 d  |

Na tabela 2 apresentam-se os valores de EC<sub>50</sub> obtidos nos vários ensaios de actividade antioxidante realizados em carpóforos de *L. piperatus* em diferentes fases de maturação.

A fase II revelou melhores propriedades antioxidantes (valores de EC<sub>50</sub> significativamente mais baixos;  $p < 0,05$ ) o que esta em concordância com o maior conteúdo de compostos antioxidantes encontrado nessa fase. Os valores de EC<sub>50</sub> obtidos para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e para o poder redutor foram melhores do que os obtidos para a inibição da hemólise de eritrócitos e para a inibição da peroxidação lipídica (POL).

**Tabela 2.** Valores de EC<sub>50</sub> obtidos nos testes de avaliação da actividade antioxidante de *Lactarius piperatus* em diferentes fases de maturação. Em cada linha, letras diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

| Valores de EC <sub>50</sub> (mg/L) | Fase I       | Fase II      | Fase III     | Fase IV      |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Efeito bloqueador                  | 13.92±0.73 c | 5.19±0.03 d  | 20.24±0.78 b | 23.44±3.33 a |
| Poder redutor                      | 2.83±0.01 c  | 2.29±0.02 d  | 5.40±0.05 b  | 5.50±0.03 a  |
| Inibição da hemólise               | 32.92±0.72 c | 12.14±0.03 d | 38.91±0.18 b | >50.0 a      |
| Inibição da POL                    | 15.26±4.15 c | 12.08±3.15 c | 34.25±5.46 b | 45.06±2.21 a |

Cerca de dois terços das mortes relacionadas com tumores podem ser evitadas através de um estilo de vida saudável. Assim uma dieta adequada que envolva o consumo de antioxidantes, nomeadamente os existentes nos cogumelos, pode minimizar os riscos de cancro. Assim, é importante saber a fase de maturação do carpóforo mais adequada para o seu consumo no que concerne à produção de antioxidantes e, pelo que nos apercebemos, este estudo é o primeiro a demonstrar que a produção de componentes antioxidantes por cogumelos silvestres e as suas propriedades antioxidantes dependem da fase de maturação do corpo frutificante.

### Agradecimentos

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projecto de investigação POCI/AGR/56661/2004).

### Referências

- [1] G.M. Williams, M.J. Iatropoulos - *Oxidants, antioxidants, and free radicals*, Taylor & Francis, USA (1997) 341-350.
- [2] C. Kandaswami, E. Middleton - *Natural antioxidants. Chemistry, health effects and practical applications*, Champaign, IL, AOCS Press (1997) 174-194.
- [3] I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, L. Barros - *Food Chem.* **100** (2007) 1511-1516.
- [4] L. Barros, M.-J. Ferreira, B. Queirós, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista - *Food Chem.* (2007) in press.
- [5] G.-C. Yen, C.-Y. Hung - *Food Res. Int.* **33** (2000) 487-492.
- [6] J.-L. Mau, H.-C. Lin, S.-F. Song - *Food Res. Int.* **35** (2002) 519-526.
- [7] J.-H. Yang, H.-C. Lin, J.-L. Maub - *Food Chem.* **77** (2002) 229-235.
- [8] L.M. Cheung, P.C.K. Cheung, V.E.C. Ooi - *Food Chem.* **81** (2003) 249-255.
- [9] J.-L. Mau, C.-N. Chang, S.-J. Huang, C.-C. Chen - *Food Chem.* **87** (2004) 111-118.
- [10] L.M. Cheung, P.C.K. Cheung - *Food Chem.* **89** (2005) 403-409.
- [11] K.M. Lo, P.C.K. Cheung - *Food Chem.* **89** (2005) 533-539.
- [12] A. Turkoglu, M.E. Duru, N. Mercan, I. Kivrak, K. Gezer - *Food Chem.* **101** (2007) 267-273.
- [13] V.L. Singleton, J.A. Rossi - *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1965) 144-158.
- [14] Z. Jia, M. Tang, J. Wu - *Food Chem.* **64** (1999) 555-559.
- [15] B.P. Klein, A.K. Perry - *J. Food Sci.* **47** (1982) 941-945.
- [16] M. Nagata, I. Yamashita - *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* **39** (1992) 925-928.
- [17] T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda - *Chem. Pharm. Bull.* **36** (1988) 2090-2097.
- [18] M. Oyaizu - *Jap. J. Nutri.* **44** (1986) 307-315.
- [19] M. Miki, H. Tamia, M. Mino, Y. Yamamoto, E. Niké - *Arch. Biochem. Biophys.* **258** (1987) 373-380.
- [20] S. Mi-Yae, K. Tae-Hun, S. Nak-Ju - *Food Chem.* **82** (2003) 593-597.



# AVALIAÇÃO DO TEOR EM ALICINA EM POPULAÇÕES REGIONAIS DE ALHO

Reis, A.<sup>1</sup>; Faria, M.A.<sup>3</sup>, Rocha, J.<sup>2</sup>, Bulhões, S.<sup>2</sup>, Barata, A.<sup>1</sup>, Nunes, E.<sup>2</sup>, Oliveira, M.B.P.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Banco Português de Germoplasma Vegetal, DRAEDM, Quinta de S. José, S. Pedro de Merelim, 4700 Braga. Tel. 253 300 960 Fax. 253 300 961. areis@draedm.min-agricultura.pt

<sup>2</sup> CIBIO-Laboratório de Genética Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Campus Agrário de Vairão. Rua Padre Armando Quintas, Vairão, 4485-661 Vairão. enunes@fc.up.pt

<sup>3</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto. beatoliv@ff.up.pt

**Palavras-chave:** *Allium*; Alicina; HPLC; Biodiversidade

**Resumo:** Desde sempre o alho (*Allium sativum* L.) foi usado como planta medicinal. Várias propriedades terapêuticas têm sido descritas, algumas atribuídas à alicina, o tiosulfonato presente em maior quantidade no alho e responsável pelo seu aroma e paladar característicos. De salientar que acima de 4 mg/g de alicina, o alho considera-se com valor medicinal. O objectivo deste estudo foi caracterizar as populações de alho existentes no Banco Português de Germoplasma Vegetal relativamente ao seu teor em alicina, utilizando a técnica de HPLC tendo como padrão externo uma solução de alicina purificada por extracção em fase sólida (SPE). Encontraram-se diferenças significativas entre as populações regionais de alho, cujos teores em alicina variam entre 0,28 e 6,65 mg/g de peso seco.

## INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta herbácea da família das *Alliaceae*, muito utilizada como condimentar e também, de forma tradicional, como medicinal. Vavilov em 1951 e Kazakova em 1971 propuseram a Ásia Central como o centro de origem primário desta espécie e o Mediterrâneo e Cáucaso como centros de origem secundários.<sup>[1]</sup> O alho terá sido uma das primeiras espécies vegetais a ser domesticada, e encontra-se hoje distribuída por todo o mundo. Já nas civilizações Egípcias, Gregas e Romanas o alho era utilizado pelas suas propriedades medicinais, facto confirmado por resultados recentes e em adição às suas propriedades antimicrobianas pode também estar associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares e oncológicas.<sup>[2]</sup>

Os constituintes do alho são divididos em dois grandes grupos, os compostos sulfurosos e os compostos não sulfurosos. A grande maioria dos efeitos medicinais do alho está relacionada com um composto sulfuroso denominado de alicina. O dente de alho intacto não contém alicina, mas o seu precursor a aliína, a qual é convertida em alicina quando os tecidos do bulbo são danificados, por acção da enzima alinase.<sup>[3]</sup> A quantidade de alicina presente nos bulbos de alho é muito variável e depende de factores ambientais e genéticos.<sup>[4]</sup>

O cultivo e o consumo de alho estão profundamente enraizados nos hábitos dos portugueses, mas apesar disso os ecótipos tradicionalmente cultivadas pelos nossos agricultores encontram-se em perigo de erosão genética, devido à introdução de cultivares estrangeiras.

No nosso trabalho foram determinados os teores em alicina em trinta populações de *Allium sativum* L. da colecção do Banco Português de Germoplasma Vegetal (BPGV) que desde 1990 tem vindo a colher material de *Allium*, de forma a preservar este património genético. De acordo com a Farmacopeia Inglesa o mínimo de alicina para assegurar a importância medicinal é de 4,5 mg/g.<sup>[4]</sup>

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram seleccionadas 30 populações, sendo 5 de alho branco e 25 de alho roxo. Como testemunhas foram utilizados 3 alhos comerciais de origem espanhola (sprint, roxo, branco). Os bulbos foram sujeitos a secagem a 50 C° e transformados em pó. O pó obtido foi mantido seco (3-5% de humidade) e pode ser armazenado a temperatura ambiente pelo menos durante 1 ano sem perdas na quantidade de alicina.<sup>[5]</sup>

As análises em HPLC foram executadas tendo por base o método desenvolvido por Lawson *et al*, 1991. Para tal utilizou-se um cromatógrafo líquido Jasco (bomba PU-2080 Plus; Misturador HG-980-30 e detector de díodos MD 2010 Plus) utilizando uma coluna de fase reversa HyPurity c18 de tamanho 150x3 mm e partícula de 5 µm (Thermo Electron Corporation). As amostras foram preparadas adicionando-se 400 mg de pó de alho a 50 ml de água ultra-pura. Deixou-se incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente, antes de se centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Retiraram-se 600 µl de sobrenadante e adicionaram-se 600 µl de metanol. Procedeu-se a uma nova centrifugação, nas mesmas condições. O líquido sobrenadante foi filtrado através de um filtro de HPLC de 0,45 µm. As amostras foram então mantidas em gelo e imediatamente injectadas, pois na mistura de metanol/água, a alicina torna-se instável à temperatura ambiente.

O eluente usado para a separação foi uma mistura de metanol:água (30:70) a um fluxo de 1ml/min. A detecção fez-se a 240nm. Nestas condições o pico de alicina surge por volta dos 4,5 min. (Figura 1).

A calibração é feita com um padrão externo utilizando uma solução de alicina purificada por extracção em fase sólida (SPE). A alicina foi doseada nesta solução por espectrofotometria UV, tendo-se preparado padrões nas seguintes concentrações: 2.20 µg/ml, 4.40 µg/ml, 8.80 µg/ml, 17.60 µg/ml, 26.40 µg/ml, 35.20 µg/ml, 44.00 µg/ml.

Em cada população foram utilizadas 3 repetições e os dados foram analisados usando o programa estatístico MSTAT-C (versão 2.10)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para cada uma das populações apresentam-se na tabela 1. Os teores de alicina situam-se entre 0,28 e 6,58 mg/g de peso seco.

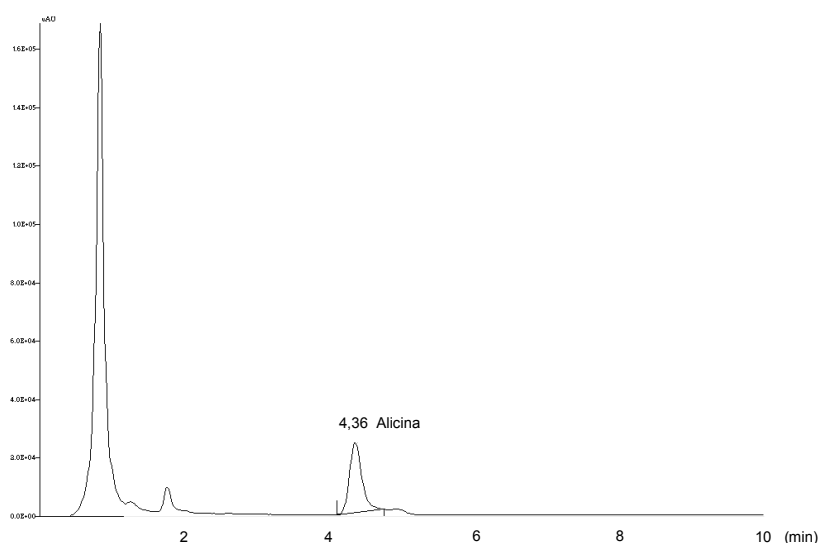


Figura 1 – Perfil Cromatográfico de um extracto de Alho

De acordo com análise estatística efectuada o valor mais alto foi obtido na Pop5, originária de Reguengos de Monsaraz, da ordem dos 6,5 mg/g de peso seco. Os valores encontrados situam-se um pouco abaixo do normalmente descrito na bibliografia, no entanto quando se procede à secagem e moenda dos bolbos, as perdas em teores de alicina podem atingir valores da ordem dos 60 %.<sup>[5]</sup>

As testemunhas (Test1, Test2 e Test3) apresentam valores de 0.83, 1.84, 1.55 que se situam nos valores abaixo da média.

Os alhos do tipo branco distinguem-se pelos valores inferiores de teor em alicina (Figura 2). Com excepção da Test2, todas as outras populações de alho branco se situam abaixo de 1mg/g

Tabela 1 – Origem e teor em alicina e nos 30 ecótipos e 3 testemunhas em estudo

| Ecótipo | Origem                | Alicina (mg/g) $\pm$ SD | Tipo de alho |
|---------|-----------------------|-------------------------|--------------|
| Pop1    | Ponte de Lima         | 1.01 $\pm$ 0.02         | Roxo         |
| Pop2    | Esposende             | 3,73 $\pm$ 0.07         | Roxo         |
| Pop3    | Campo Maior           | 4.71 $\pm$ 0.09         | Roxo         |
| Pop4    | Portalegre            | 6.22 $\pm$ 0.23         | Roxo         |
| Pop5    | Reguengos de Monsaraz | 6.58 $\pm$ 0.54         | Roxo         |
| Pop6    | Évora                 | 4,95 $\pm$ 0.40         | Roxo         |
| Pop7    | Elvas                 | 5.20 $\pm$ 0.14         | Roxo         |
| Pop8    | Elvas                 | 3.71 $\pm$ 0.21         | Roxo         |
| Pop9    | Serpa                 | 2.63 $\pm$ 0.11         | Roxo         |
| Pop10   | Barrancos             | 1.11 $\pm$ 0.03         | Roxo         |
| Pop11   | Barrancos             | 0.78 $\pm$ 0.03         | Roxo         |
| Pop12   | Tavira                | 2.95 $\pm$ 0.15         | Roxo         |
| Pop13   | Portalegre            | 3.57 $\pm$ 0.22         | Roxo         |
| Pop14   | Campo Maior           | 4.15 $\pm$ 0.26         | Roxo         |
| Pop15   | Évora                 | 4.75 $\pm$ 0.33         | Roxo         |
| Pop16   | Arraiolos             | 1.01 $\pm$ 0.03         | Roxo         |
| Pop17   | Beja                  | 2.55 $\pm$ 0.08         | Roxo         |
| Pop18   | Aljustrel             | 1.01 $\pm$ 0.06         | Roxo         |
| Pop19   | Loulé                 | 0.65 $\pm$ 0.04         | Roxo         |
| Pop20   | Elvas                 | 0.29 $\pm$ 0.01         | Branco       |
| Pop21   | Serpa                 | 0.28 $\pm$ 0.01         | Branco       |
| Pop22   | Terras de Bouro       | 0.70 $\pm$ 0.02         | Branco       |
| Pop23   | Esposende             | 1.74 $\pm$ 0.04         | Roxo         |
| Pop24   | Viana do Castelo      | 2.79 $\pm$ 0.04         | Roxo         |
| Pop25   | Amarante              | 1.11 $\pm$ 0.02         | Roxo         |
| Pop26   | Vieira do Minho       | 1.75 $\pm$ 0.08         | Roxo         |
| Pop27   | Viana do Castelo      | 2.85 $\pm$ 0.02         | Roxo         |
| Pop28   | Viseu                 | 0.48 $\pm$ 0.02         | Branco       |
| Pop29   | Torre de Moncorvo     | 0.61 $\pm$ 0.05         | Branco       |
| Pop30   | Redondo               | 0.36 $\pm$ 0.01         | Roxo         |
| Test1   | Espanha               | 0.83 $\pm$ 0.08         | Roxo         |
| Test2   | Espanha               | 1.84 $\pm$ 0.01         | Branco       |
| Test3   | Espanha               | 1.55 $\pm$ 0.06         | Roxo         |

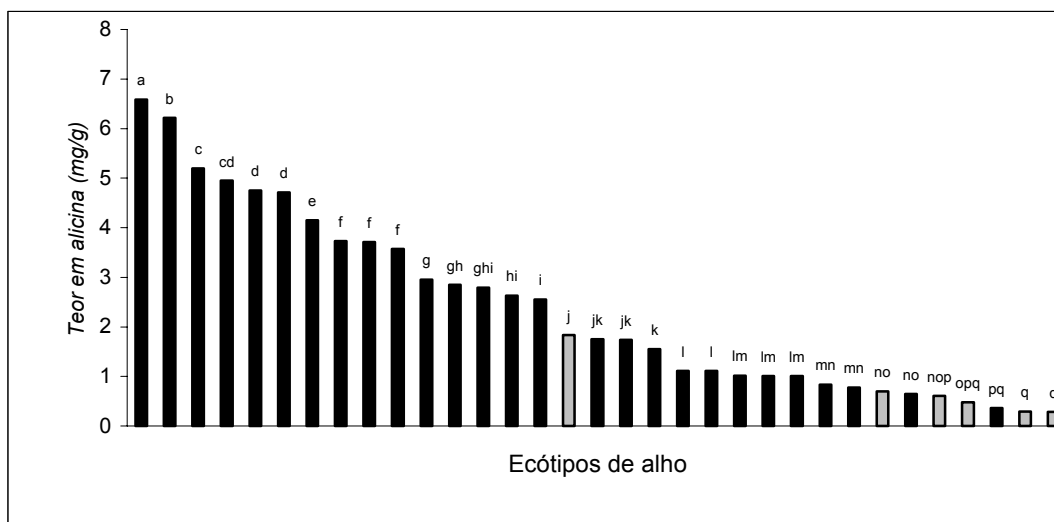


Figura 2 – Teor em alicina dos vários ecótipos de Alho em estudo (letras diferentes no topo das colunas significam diferenças estatísticas significativas)  Roxo  Branco

O teor em alicina para além das outras características morfológicas e agronómicas das populações pode ser utilizado como um factor de melhoramento nesta espécie. Assim quando o teor em alicina é elevado a cultivar/ecótipo pode ser considerada com interesse medicinal. Nas populações estudadas, provenientes da colecção de *Allium* do BPGV, existem algumas com valores de alicina interessantes, que poderão ser claramente consideradas com valor medicinal.

### Referencias

- [1] – H.D. Rabinowitch and L. Currah (ed.)- *Allium Crop Science: Recent Advances*, CAB International (2002)
- [2] – Robert E.C. Widman (ed.) – *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, CRS Press (2001)
- [3] - K. Baghalian, S.A.Ziai, M.R.Naghavi, H.N.Badi, A.Khalighi - *Scientia Horticulturae* **103** (2005)155
- [4] – A. Camargo, R.W.Masuelli, J.L. Burba – *Acta Horticulturae* **688** (2005) 309
- [5] – H.P. Koch and L.D.Lawson (ed.) – *Garlic. The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, Williams & Wilkins (1996)

# BETA-CAROTENO E LUTEÍNA EM AZEITES DOP

*Maia, L.<sup>1</sup>, Casal, S.<sup>1</sup>, Alves, R.<sup>2</sup>, Oliveira, M.B.P.P.<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto

<sup>2</sup>ESTG, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Av. do Atlântico, Apartado 574, 4900 Viana do Castelo

Tel +351-222078902 Fax +351-222003977 e-mail: beatoliv@ff.up.pt

**Palavras-chave:** beta-caroteno, luteína, azeites, DOP

**Resumo:** O azeite é parte integrante da dieta mediterrânica, sendo muito apreciado num número cada vez maior de países, pelas suas características organolépticas bem como pelas suas propriedades biológicas e preventivas/terapêuticas. O azeite virgem inclui na sua composição compostos com actividade antioxidante, nomeadamente tocoferóis, fenóis e carotenóides. Aos carotenóides é ainda atribuída uma actividade pró-vitáminica A, a melhoria da funcionalidade de diversos órgãos e do sistema imunitário, bem como a prevenção de doenças cardiovasculares e cancro.

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar o teor em carotenóides de azeites DOP, particularmente a luteína e o beta-caroteno. Foram avaliados 38 azeites, sendo 25 portugueses, 6 espanhóis e 7 italianos. Os compostos foram separados por extracção líquido-líquido sendo o beta-caroteno quantificado por UV/VIS, a 454 nm, por correlação com um padrão externo, e a luteína separada e quantificada por HPLC de fase reversa/detector de díodos, com um padrão interno adequado.

Os teores encontrados variaram entre 1 e 6 mg/kg para a luteína e de 1 a 8 mg/kg no beta-caroteno. Verificaram-se diferenças entre os azeites dos três países em estudo, com os azeites espanhóis a apresentarem valores de beta-caroteno inferiores aos restantes e os azeites italianos com menor teor de luteína. Estas diferenças parecem justificar-se com a origem geográfica, as condições ambientais e a topologia do solo.

## 1. INTRODUÇÃO

A dieta Mediterrânica é um padrão alimentar que inclui um estilo de vida e uma cultura típicos, sendo descrito como promotor de saúde e qualidade de vida. O azeite é um dos mais importantes componentes desta dieta, sendo apreciado, num número cada vez maior de países, pelas suas características organolépticas e pelas suas propriedades biológicas e preventivas/terapêuticas. O azeite virgem inclui na sua composição compostos com actividade antioxidante, nomeadamente tocoferóis, fenóis e carotenóides.<sup>1,2</sup>

Os carotenóides são compostos tetraterpenóides que se dividem em: carotenos (ex:  $\beta$ -caroteno) e xantofilas (ex: luteína). A sua principal característica química é a presença de um sistema de ligações duplas conjugadas que lhe confere simultaneamente uma grande capacidade para absorver luz em comprimentos de onda característicos e uma enorme susceptibilidade térmica e oxidativa. Aos carotenóides são atribuídas inúmeras propriedades, nomeadamente actividade pró-vitamina A, melhoria da funcionalidade de diversos órgãos e do sistema imunitário, bem como prevenção doenças cardiovasculares e cancro.<sup>1,2</sup>

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem

Na realização deste trabalho foram analisados azeites virgem-extra, de denominação de origem protegida (DOP), comercializados em Portugal, Espanha e Itália, num total de 38

amostras. As amostras portuguesas, num total de 25, pertenciam às cinco regiões DOP portuguesas. As 6 amostras espanholas representavam 4 das 17 regiões DOP de Espanha. Por sua vez as amostras italianas (n=7) pertenciam a 2 regiões DOP das 37 existentes em Itália.

## 2.2. Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados na preparação das soluções padrão foram: tetrahydrofurano, 2-propanol e *n*-hexano (com grau de pureza para HPLC) fornecidos pela Merck e butil-hidroxitolueno (BHT) fornecido pela Sigma-Aldrich. Os restantes reagentes eram de pureza analítica ou superior.

O acetonitrilo e acetato de etilo utilizados na separação cromatográfica com um grau de pureza adequado a HPLC, foram fornecidos pela Sigma. O eluente A era constituído por uma solução de acetonitrilo: água (9:1, v/v) com 0,01% de BHT. O eluente B era acetato de etilo. A solução de retoma do extracto submetido à separação cromatográfica continha acetonitrilo e acetato de etilo na proporção 1:1 e BHT a 0,1%.

A luteína (xantophyll alfalfa), o  $\beta$ -caroteno (*all-E*- $\beta$ -caroteno) e o  $\beta$ -apo-8'-carotenal (padrão interno) foram fornecidos pela Fluka, Espanha.

## 2.3. Equipamento

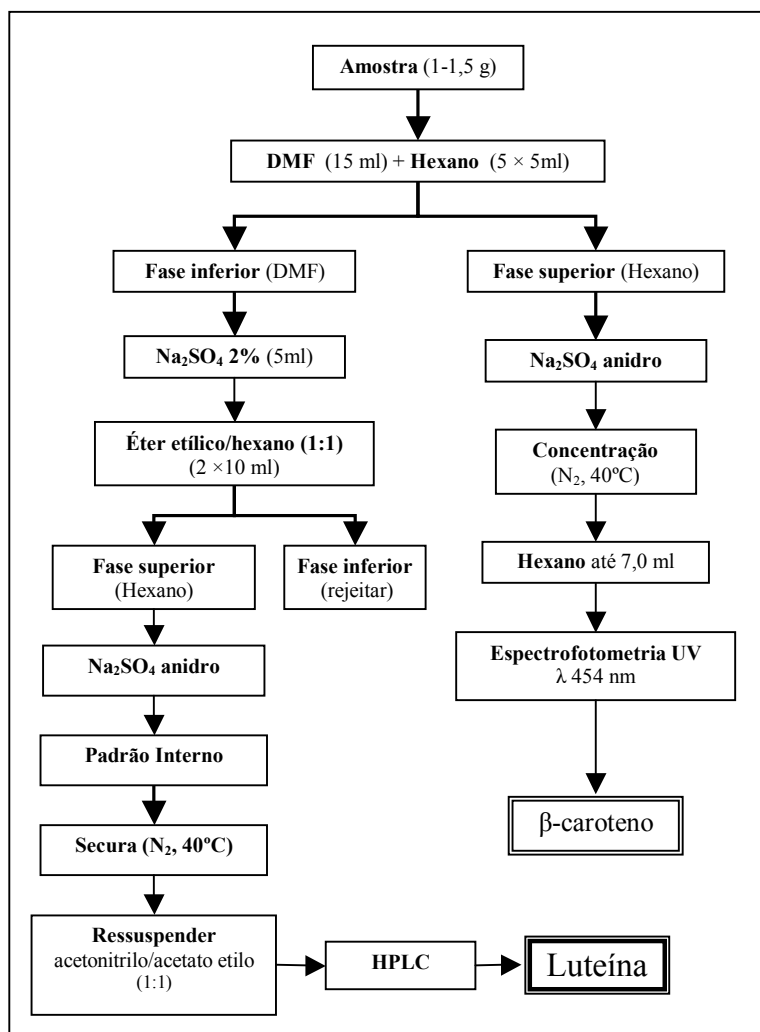
As determinações de massa foram efectuadas numa balança analítica Mettler®, modelo Toledo AG204 (Suíça). Para a extracção foram necessários agitação em vortex Heidolph, modelo Reax 2000 (EUA) e centrifugação a 5000 rpm em centrífuga Heraeus Sepatech, modelo Labofuge A (Alemanha). No processo de concentração dos extractos utilizou-se uma corrente de azoto numa unidade de evaporação Reacti-Vap (Pierce, USA).

O sistema cromatográfico era da Jasco (Japão), sendo composto por duas bombas de alta pressão PU-980 e um detector de díodos MD-910 com varrimentos entre 195 e 650 nm. O  $\beta$ -caroteno foi determinado num espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV 160A), a 454 nm, em células de quartzo com 1cm.

O sistema de aquisição de dados foi o Borwin™ PDA Controller Software (JMBS, França), versão 1.50. Para tratamento dos dados foram utilizados os programas informáticos Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, USA) e Statistica for Windows (Statsoft, Tulsa, OK).

## 2.4. Protocolo Analítico

O método analítico foi adaptado de um método já publicado (3,4). Para a extracção dos compostos, no mínimo em duplicado, utilizaram-se tomas de 1 a 1,5g. O protocolo analítico que permitiu a separação das duas fracções encontra-se detalhado na Figura 1.



**Figura 1:** Protocolo extractivo utilizado

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos apontam para uma grande variabilidade quer entre os países quer mesmo dentro de cada país (Figuras 2 e 3). Na generalidade, o teor em  $\beta$ -caroteno apresenta-se superior ao da luteína, excepto nas amostras espanholas onde os valores são inferiores ou muito semelhantes ao desta.

No que se refere à luteína (Figura 2) os valores médios mais elevados foram encontrados nas amostras espanholas ( $n=6$ ), com um teor médio de  $3,6 \pm 1,1$  mg/kg, seguidos dos azeites portugueses com  $2,4 \pm 1,0$  mg/kg ( $n=25$ ), e dos italianos com  $1,6 \pm 0,5$  mg/kg ( $n=7$ ). Todos estes valores se apresentam significativamente diferentes ( $P < 0,001$ ).

Os teores médios em  $\beta$ -caroteno variaram de forma inversa, com as amostras italianas a apresentarem a média mais elevadas, com  $5,1 \pm 1,1$  mg/kg, semelhantes à dos azeites portugueses com  $5,0 \pm 1,0$  mg/kg e por último os espanhóis com  $3,2 \pm 0,9$  mg/kg (Figura 3). Os teores apresentados pelas amostras espanholas são significativamente inferiores aos dos restantes países ( $P < 0,001$ ). No caso das amostras portuguesas e italianas não se verificam diferenças significativas.

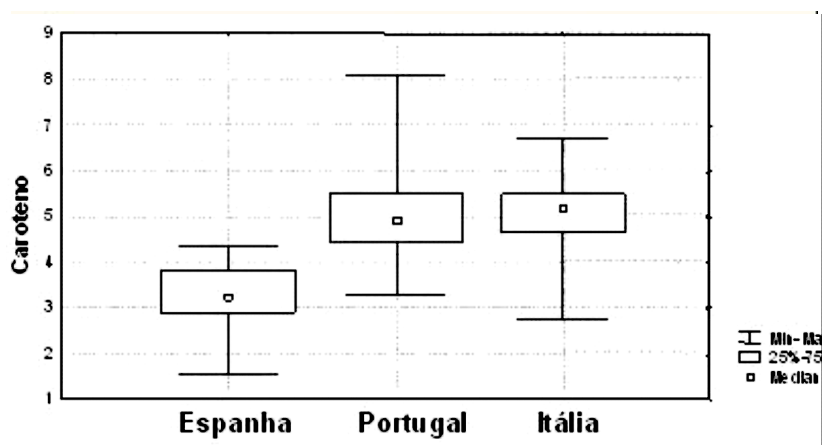


Figura 2 - Teores de luteína presentes nos 3 países

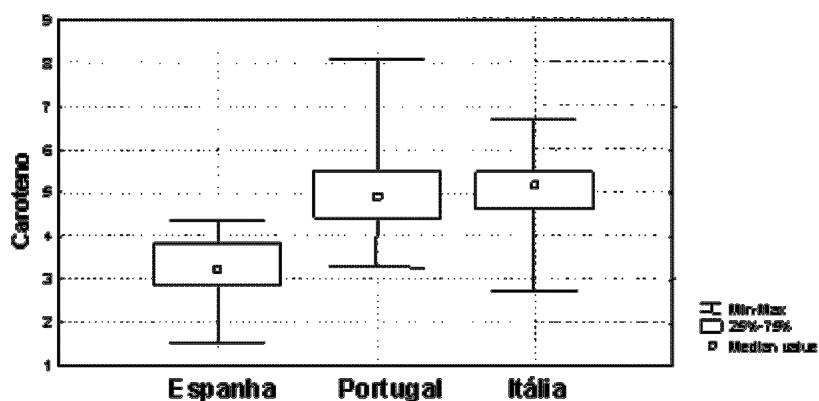


Figura 3 - Teores de β-caroteno presentes nos 3 países

A maior dispersão nos teores que se observa nas amostras portuguesas poderá dever-se ao facto de estas englobarem todas as regiões DOP existentes, o mesmo não sucedendo com as amostras espanholas e italianas. Itália possui 37 regiões DOP de azeite, embora a quase totalidade das amostras avaliadas neste trabalho pertença a uma região DOP, a Toscana, o que certamente contribui para uma menor dispersão de resultados. Espanha tem igualmente 17 regiões de azeite DOP, sendo que neste trabalho apenas se encontram representadas 4 dessas regiões DOP que pertencem à mesma comunidade autónoma espanhola, a Andaluzia. Estas diferenças parecem justificar-se com a origem geográfica, as condições ambientais e a topologia do solo.

## Referências

- [1] – I. Krinsky – Ann. New York Acadm. Sci. **854** (1998) 443
- [2] – L. Feltl, V. Pacákovo, K. Stulík, K. Volka – Curr. Anal. Chem. **1** (2005) 93
- [3] – M. I. Minguez-Mosquera, B. Gandul-Rojas, M. L. Gallardo-Guerrero – J. Agric. Food Chem. **40** (1992) 60
- [4] – M.M. Mendes-Pinto, A.C.S. Ferreira, M.B.P.P. Oliveira, P. Guedes de Pinho – J. Agric. Food Chem. **52** (2004) 3182



# CAFÉ EXPRESSO: CARACTERIZAÇÃO DO SEU TEOR EM HARMANA E NORHARMANA

*Alves, R. C. \*, Casal, S., Oliveira, B.*

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto  
Tel +351-222078902 Fax +351-222003977 e-mail: ralves@ff.up.pt

**Palavras-chave:** norharmana, harmana,  $\beta$ -carbolinas, café expresso

**Resumo:** O café expresso é mundialmente apreciado pelas suas características peculiares. O “corpo” e a espuma densa e aveludada são as que mais o distinguem das outras bebidas de café.

O impacto do café na saúde tem sido alvo de diversos estudos, apontando os mais recentes para um potencial efeito benéfico de alguns dos seus constituintes. Particularmente, o consumo moderado de café tem sido associado a uma diminuição do risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. Pensa-se que duas  $\beta$ -carbolinas formadas durante a torra do café (harmana e norharmana) possam ser responsabilizadas, pelo menos em parte, por esse efeito, ao apresentarem capacidade para inibirem as monoaminoxidases.

Neste trabalho analisou-se o teor de harmana e norharmana em cafés expresso preparados a partir de lotes comerciais (regulares, descafeinados e pastilhas), por RP/HPLC/FLD. Os teores por bebida (30 mL) variaram entre 3,6 e 10,4  $\mu$ g de norharmana e entre 1,2 e 4,3  $\mu$ g de harmana, pertencendo os valores mais baixos a lotes estremos de arábica. O processo de descafeinização não parece afectar os teores destes compostos. O volume da bebida influencia directamente o teor final das  $\beta$ -carbolinas na bebida, extraíndo-se entre 30 a 70% dos compostos existentes no café. O tempo entre a preparação e o consumo foi igualmente avaliado, mostrando não haver alteração nos seus teores, pelo menos durante uma hora. Comparativamente com outras bebidas de café, apesar do expresso ser a mais concentrada, é aquela que menos contribui para o aporte de  $\beta$ -carbolinas, devido ao seu pequeno volume. A ingestão diária destes compostos depende, assim, de múltiplos factores, sendo de destacar, no caso do café expresso, a composição da mistura utilizada, o volume da bebida e o número de chávenas ingerido diariamente.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade do café expresso depende de diversos factores, nomeadamente, das espécies de café utilizadas para preparar a mistura, ou *blend*, (*Coffea arabica* e *Coffea canephora* var. *robusta*), tipo de torra, grau de moagem, pressão e temperatura da água, volume da bebida, etc. Intervêm na sua composição milhares de compostos químicos, alguns dos quais com propriedades biológicas [1]. Associa-se, por exemplo, o consumo moderado de café a um menor risco de incidência da doença de Parkinson. Duas  $\beta$ -carbolinas formadas durante a torra do café (harmana e norharmana) poderão ser responsabilizadas, pelo menos em parte, por esse efeito, uma vez que apresentam capacidade de inibição das monoaminoxidases [2]. Este trabalho teve como objectivo avaliar a influência de alguns factores no teor de harmana e norharmana no café expresso: espécies de café (arábica e robusta), variação do volume da bebida e tempo após a sua extracção. Os teores foram estudados em expressos de diversos lotes comerciais (regulares, descafeinados e pastilhas), sendo alguns posteriormente comparados com outras bebidas de café: moka, press-pot e café de filtro.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

As amins harmana (H) e norharmana (NH) foram obtidas na Aldrich (Steinheim, Alemanha) e Sigma (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. O padrão interno (harmalina) foi adquirido à Fluka (Neu-Ulm, Alemanha). Todos os outros reagentes eram de grau analítico ou de HPLC e foram fornecidos, maioritariamente, pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

### 2.2. Amostras de café

Os *blends* de café (em grão, moído e pastilhas) foram adquiridos em superfícies comerciais. As amostras estremes (arábica e robusta) foram cedidas por uma indústria (BICAFÉ). Para a preparação dos cafés expresso, a partir de café em grão, utilizou-se uma máquina automática (KRUPS XP7220P0, Alemanha). Os cafés expresso de pastilhas foram extraídos com uma Espresso Professional PHILIPS HL3854/A (Holanda). Os cafés moka (25 g/200 mL) foram preparados numa Delonghi EMK6 Alicia Electric Moka Espresso Maker (Itália). Para preparar cafés de filtro, foi usada uma Krups CaféPresso 10 Plus (Alemanha) (27,5 g/500 mL). Os cafés Press-Pot foram extraídos com uma French Press Coffee Maker da Bodum (Suíça) (27,5 g/500 mL) [3].

### 2.3. Extração e quantificação dos compostos

Para extrair os compostos das bebidas de café, seguiu-se um método previamente publicado por Herraiz [4]. O procedimento utilizado para determinar a quantidade total de  $\beta$ -carbolinas no café moído baseou-se no descrito por Gomes [5]. A análise cromatográfica realizou-se num sistema de HPLC (Jasco, Japão) constituído por: injector automático AS-950, bomba de eluentes PU-1580, unidade de gradiente quaternária LG-1580-04, desgaseificador DG-1580-54 e detector de fluorescência programável FP-920. A separação cromatográfica efectuou-se numa coluna de fase reversa Teknokroma Tracer Excel ODSA (5  $\mu$ m; 250 x 4 mm) (Espanha). O sistema de solventes consistiu num gradiente de tampão fosfato 0,03 M com ácido trifluoroacético 0,025 M (pH 3,0) (A) e acetonitrilo (B). Os dados foram analisados no Borwin-PDA Controller Software (JMBS, France). A quantificação teve como base o método do padrão interno. A análise estatística usou a ANOVA de factor único e o teste *t* de Student.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Variabilidade em amostras comerciais.

Os cafés expresso dos diferentes lotes comerciais apresentaram uma grande dispersão (Tabela 1). Os valores variaram entre 3,6 e 10,4  $\mu$ g para a NH e entre 1,2 e 4,3  $\mu$ g para a H. Os valores mais baixos foram encontrados nos cafés estremes (100% arábica), sugerindo que a adição de robusta ao *blend* poderá ser responsável pelo aumento do teor destes compostos na bebida. A descafeinização não parece afectar os teores de  $\beta$ -carbolinas, comparativamente com os dos cafés regulares.

**Tabela 1 – Teor de norharmana e harmana em cafés expresso de amostras comerciais\***

| Amostras comerciais             | n         | NH µg/ 30 mL de café expresso |                   | H µg/ 30 mL de café expresso |                  |
|---------------------------------|-----------|-------------------------------|-------------------|------------------------------|------------------|
|                                 |           | média ± dp                    | variação          | média ± dp                   | variação         |
| Regulares ( <i>blends</i> )     | 14        | 7,39 ± 1,78                   | 4,20-10,37        | 2,82 ± 0,76                  | 1,42-4,35        |
| Regulares (100% arábica)        | 2         | 4,10 ± 0,66                   | 3,63-4,57         | 1,70 ± 0,42                  | 1,40-2,00        |
| Descafeinados ( <i>blends</i> ) | 3         | 6,92 ± 2,55                   | 4,58-9,64         | 1,9 ± 0,93                   | 1,17-2,95        |
| Pastilhas ( <i>blends</i> )     | 6         | 8,54 ± 1,21                   | 7,07-10,24        | 2,70 ± 0,52                  | 1,95-3,22        |
| <b>Total</b>                    | <b>25</b> | <b>7,73 ± 1,14</b>            | <b>3,63-10,37</b> | <b>2,30 ± 0,57</b>           | <b>1,17-4,35</b> |

\* NH, norharmana; H, harmana; dp, desvio padrão

### 3.2. Influência do volume

A influência do volume de água (20-70 mL) na extracção das  $\beta$ -carbolinas para o café expresso foi estudada para ambas as espécies: arábica ( $n=2$ ) e robusta ( $n=2$ ) (Tabela 2). Os cafés expresso de 20 mL contêm aproximadamente metade dos teores de NH e H que os de 70 mL. Verifica-se um elevado factor de correlação (0,9) entre o volume da bebida e o seu teor em  $\beta$ -carbolinas. Existem, ainda, diferenças significativas ( $P<0,01$ ) nos teores destas entre os diferentes volumes testados. Agrupando as amostras por espécie (arábica ou robusta) observa-se que esta significância estatística ( $P<0,01$ ) só se mantém para o grupo dos robustas (Tabela 2). No grupo dos arábicas encontrou-se uma correlação menor ( $r=0,6$  para ambos os compostos), devido à grande variabilidade entre as duas amostras arábica analisadas, o que justifica os desvios padrão descritos para este grupo (Tabela 2). A razão NH/H foi sempre de aproximadamente 3, apresentando-se independente do volume.

**Tabela 2 - Variação do teor de norharmana e harmana com o volume do café expresso<sup>a</sup>**

|                        | Volume do café expresso (mL) |              |              |              |              |              | r      | S    |
|------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|------|
|                        | 20                           | 30           | 40           | 50           | 60           | 70           |        |      |
| <b>Arábica (n = 4)</b> |                              |              |              |              |              |              |        |      |
| NH (µg/EC)             | 2,99 ± 0,57                  | 3,74 ± 1,27  | 4,33 ± 1,23  | 4,91 ± 1,62  | 5,70 ± 2,76  | 6,34 ± 2,82  | 0,6452 | n.s. |
| H (µg/EC)              | 1,15 ± 0,31                  | 1,45 ± 0,58  | 1,75 ± 0,61  | 1,89 ± 0,73  | 2,28 ± 1,11  | 2,15 ± 0,65  | 0,5862 | n.s. |
| % de extracção         | 29 ± 5                       | 35 ± 2       | 42 ± 4       | 46 ± 4       | 53 ± 3       | 56 ± 6       | 0,9185 | *    |
| <b>Robusta (n = 4)</b> |                              |              |              |              |              |              |        |      |
| NH (µg/EC)             | 8,85 ± 0,00                  | 11,56 ± 0,83 | 13,63 ± 0,27 | 14,94 ± 0,73 | 17,36 ± 1,10 | 17,91 ± 0,67 | 0,9749 | *    |
| H (µg/EC)              | 2,93 ± 0,15                  | 3,88 ± 0,40  | 4,83 ± 0,90  | 5,03 ± 0,14  | 6,22 ± 0,04  | 6,44 ± 0,27  | 0,9540 | *    |
| % de extracção         | 33 ± 1                       | 43 ± 2       | 52 ± 4       | 56 ± 3       | 67 ± 4       | 69 ± 3       | 0,9617 | *    |

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão; r, factor de correlação; S, significância estatística (ANOVA): \* =  $P<0,01$ ; n.s. = não significativo ( $P>0,05$ ); NH, norharmana; H, harmana.

### 3.3. Influência da espécie

Os expressos de café robusta (Tabela 2) apresentaram teores cerca de 3 vezes superiores aos de arábica ( $P<0,01$ ). No caso das amostras de café arábica verifica-se uma maior dispersão de valores comparativamente aos robusta. Para um mesmo volume, a percentagem de extracção é significativamente superior ( $P<0,05$ ) nos cafés expresso de robusta.

### 3.4. Estabilidade das $\beta$ -carbolinas na bebida

A quantificação das  $\beta$ -carbolinas ocorreu 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min após a preparação de cafés expresso. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os teores dos diferentes tempos, para a NH e a H, evidenciando assim a estabilidade destes compostos na bebida.

### 3.5. Comparação do expresso com outros tipos de bebida

Na Tabela 3 os cafés expresso são comparados com outras bebidas de café, para os volumes médios geralmente consumidos [3]. Verifica-se a formação de dois grupos significativamente diferentes ( $P<0,05$ ): expresso/press-pot, com valores mais baixos, e filtro/moka. No primeiro grupo é evidente a influência do método de extração, atingindo-se teores semelhantes para proporções “massa de café moído/volume de água” diferentes. O mesmo se verifica entre o café moka e o de filtro em que no último se verifica uma menor eficiência extractiva. A diferença entre moka e press-pot deve-se certamente à quantidade de café usada, sendo o teor de compostos proporcional a esse valor. Apesar de ser utilizada a mesma massa de café no expresso e no café de filtro, o maior volume deste último permite uma melhor extração dos compostos.

**Tabela 3** - Teores de norharmana e harmana em diferentes bebidas de café \*

| Tipo de bebida   | café (g) | volume (mL) | NH                 | H                 |
|------------------|----------|-------------|--------------------|-------------------|
| <b>Espresso</b>  | 6,5      | 30          | 7,11 $\pm$ 2,71 a  | 2,99 $\pm$ 1,51 a |
| <b>Press-pot</b> | 3,5      | 60          | 8,53 $\pm$ 2,97 a  | 3,32 $\pm$ 1,45 a |
| <b>Moka</b>      | 7,5      | 60          | 16,01 $\pm$ 5,47 b | 5,76 $\pm$ 2,57 b |
| <b>Filtro</b>    | 6,5      | 120         | 18,09 $\pm$ 6,29 b | 7,03 $\pm$ 3,40 b |

\*Média  $\pm$  desvio padrão;  $n=6$ ; letras diferentes em cada coluna indicam diferenças significativas para  $P<0,05$  (teste  $t$  Student); NH, norharmana; H, harmana.

Concluindo, a exposição do ser humano às  $\beta$ -carbolinas através do café, irá certamente variar com o método de extração da bebida. No entanto, o volume e o número de doses ingeridas diariamente são factores que contribuem para essa variação. Assim, um café expresso apresenta valores distintos de norharmana e harmana, de acordo com o volume final da bebida, variando aproximadamente entre 30 a 70% da quantidade total de  $\beta$ -carbolinas encontrada no café moído. Apesar de ser uma das bebidas mais concentradas, a quantidade de compostos ingerida por chávena de expresso é mais baixa, comparativamente com outras bebidas, devido ao seu pequeno volume.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à KRUPS a disponibilização de uma máquina expresso automática e à BICAFÉ a cedência e torrefacção das amostras. Rita C. Alves agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia a concessão da bolsa SFRH/BD/22449/2005.

### Referências

- [1]- R. J. Clarke, O. G. Vitzthum (Eds.) - *In Coffee: Recent Developments*, World Agriculture Series, Cornwall (2001)
- [2]- T. Herraiz, C. Chaparro - *Life Sci.* **78** (2006) 795
- [3]- B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas (Eds.) - *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Oxford (2003)
- [4]- T. Herraiz - *Food Addit. Contam.* **19** (2002) 748
- [5]- A. F. R. Gomes - Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal (2006)

# COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS E TOCOFERÓIS DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Pinus pinea* L.

Mendonça, N.<sup>1</sup>, Bispo, P.<sup>1\*</sup>, Freire, J.<sup>2</sup>, Rodrigues, A.<sup>2</sup> and Bandarra, N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Nutrição Aplicada e Ciências da Vida - Dep. Biotecnologia Industrial e Ambiental, Universidade Independente, Av. Marechal Gomes da Costa, Lote 9, 1800-255 Lisboa, Tel +351-218361900 Fax +351- 218361922.

<sup>2</sup>Departamento de Silvicultura e Produtos Florestais - Estação Florestal Nacional, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Tel +351- 214403500 Fax +351- 214416011.

<sup>3</sup>Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca – IPIMAR, Av. De Brasília, 1449-006 Lisboa, Tel +351- 213027000 Fax +351- 213015948.

\*e-mail: [paulo.bispo@uni.pt](mailto:paulo.bispo@uni.pt)

**Palavras-chave:** pinhão, lípidos totais, perfil em ácidos gordos, tocoferóis, propriedades físicas.

## Resumo

O objectivo deste trabalho consistiu na caracterização físico-química do pinhão: em particular na determinação do teor de lípidos totais, do perfil em ácidos gordos e dos estereoisómeros da Vitamina E. A caracterização foi efectuada em pinhões provenientes de 2 produtores (num total de 4 parcelas) da região de Évora. O conteúdo médio em humidade foi de 4,77%. Os teores de lípidos totais, variaram entre 46,2% e 56,9%, com um valor médio de 50,8%. O ácido linoleico (C18:2 n-6) apresentava a maior percentagem relativa em relação ao total dos ácidos gordos, com um valor médio de 46,86±0,05% (217,70 mg/g). O ácido gordo monoinsaturado predominante era o ácido oleico (C18:1 n-9) com valores relativos a variarem entre 34,75% (CB10) e 38,59% (CB9). Os ácidos gordos saturados representavam apenas 10,85±0,04%, sendo os ácidos gordos mais representativos o palmítico e o esteárico, com valores médios de 6,32±0,03% (29,34 mg/g) e 3,79±0,01% (17,62 mg/g), respectivamente. Apenas o  $\gamma$ -tocoferol e o  $\alpha$ -tocoferol foram detectados, o  $\gamma$ -tocoferol era o maioritário, variando o seu teor entre 353 e 526  $\mu$ g/g de lípidos.

## 1. INTRODUÇÃO

A semente da espécie *Pinus pinea* L. para além de comestível e bastante apreciada apresenta, pela sua composição química, elevado interesse nutricional. Pelas suas propriedades o pinhão pode ser incluído no grupo dos alimentos funcionais, em conjunto com outros frutos secos e, deve ser considerado para a pesquisa de compostos com propriedades nutracêuticas (tais como fibra, fitoquímicos ou micronutrientes). A UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) define, no que respeita ao controlo de qualidade do pinhão, um conjunto de parâmetros que passam pela avaliação das características físicas (tamanho e peso), químicas (humidade e teor lipídico), sensoriais e microbiológicas. A informação disponível na literatura acerca da composição química do pinhão é escassa. Particularmente a que resulta de estudos efectuados em Portugal, mesmo sabendo da importância económica que o pinhão representa, e do seu contributo para as exportações nacionais. O pinhão utilizado neste trabalho provém da “Região de Proveniência”, onde estão incluídos o distrito de Évora, Santarém, Portalegre e Setúbal.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As pinhas foram obtidas de árvores da mesma espécie (*Pinus pinea* L), com diferentes níveis de desenvolvimento. As parcelas eram constituídas por povoamentos de pinheiro manso jovens (10 anos; CB3), meia-idade (50 anos; CB9 e QS4) e adultos (80 anos; CB10). As

parcelas de amostragem eram circulares com 30m de raio. Entre 4 a 6 pinhas por árvore, de 3 a 4 árvores por parcela, foram colhidas em 2005. Para a determinação das fracções do pinhão, as sementes foram quebradas manualmente e a casca, o miolo e a cutícula cuidadosamente separados e a sua proporção e características biométricas calculadas. O miolo sem cutícula foi utilizado nas determinações químicas. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado, com excepção da determinação dos lípidos totais (duplicado). Para a caracterização morfológica dos frutos com casca: comprimento (cm) e peso (g) foram medidos entre 54 e 145 sementes, em função de cada parcela (para os frutos sem casca n=5).

**Determinação da humidade:** foi efectuada seguindo as indicações da UNECE, segundo a norma ISO 665-2000 [1].

**Extracção do óleo e determinação dos lípidos totais:** antes da extracção os frutos foram triturados num total de cerca de 10g de pinhão por parcela. O óleo do material preparado foi extraído com *n*-hexano num equipamento de Soxhlet durante aproximadamente 3 horas. O solvente foi evaporado, sob vácuo, e o óleo colocado em frascos escuros a -35 °C até posterior análise.

**Caracterização do perfil em ácidos gordos do óleo:** A determinação do perfil de ácidos gordos de todas as amostras de lípidos do pinhão foi efectuada por GC, seguindo o procedimento descrito anteriormente [2]. Os Índices de Aterogenicidade (IA) e de Trombogenicidade (IT) foram calculados, em função da percentagem relativa dos ácidos gordos, segundo as fórmulas referidas na literatura [3].

**Caracterização dos tocoferóis do óleo:** O  $\alpha$  e  $\gamma$ -tocóferóis foram determinados por HPLC seguindo as indicações de análise referidas anteriormente [2].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Teor de humidade e parâmetros biométricos

Na tabela 1 estão indicados o teor de humidade e as características biométricas das diferentes parcelas. Os valores obtidos para a humidade estão de acordo com os dados disponíveis na literatura [4], e dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade (<6%) [1]. O teor de humidade pode ser utilizado como um indicador do grau de desenvolvimento do pinhão [5].

Tabela 1: Valores de humidade e características biométricas das diferentes parcelas

|                      |      | Parcelas   |            |            |            |
|----------------------|------|------------|------------|------------|------------|
|                      |      | CB3        | CB9        | CB10       | QS4        |
| Humidade             | (%)  | 4,94±0,13  | 4,70±0,16  | 5,25±0,21  | 4,20±0,07  |
| NTP                  |      | 54         | 413        | 2926       | 319        |
| hPinha               | (cm) | 10,23±0,88 | 10,07±1,06 | 10,30±1,40 | 10,36±1,36 |
| dPinha               | (cm) | 5,88±0,65  | 5,63±0,60  | 5,76±0,71  | 6,02±0,44  |
| nPinhões             |      | 103±24     | 70±21      | 98±27      | 100±31     |
| Pinhão com casca (L) | (cm) | 1,61±0,17  | 1,66±0,09  | 1,41±0,11  | 1,62±0,02  |
| Pinhão sem casca (L) | (cm) | 1,26±0,07  | 1,21±0,08  | 1,18±0,06  | 1,22±0,13  |
| Pinhão com casca     | (g)  | 0,71±0,15  | 0,72±0,14  | 0,61±0,15  | 0,67±0,09  |
| Pinhão e cutícula    | (g)  | 0,19±0,03  | 0,20±0,03  | 0,12±0,04  | 0,16±0,03  |
| Cutícula             | (g)  | 0,004±0,01 | 0,005±0,00 | 0,003±0,00 | 0,005±0,00 |

NTP: Número Total de Pinhas; hPinha: altura da pinha antes de ser aberta; dP: diâmetro maior da pinha; nPinhões: número médio de pinhões da pinha; L: comprimento.

#### 3.2. Lípidos totais e perfil em ácidos gordos

A tabela 2 mostra o perfil em ácidos gordos (%) e de lípidos totais (m/m) das diferentes parcelas. Os teores de lípidos totais, variaram entre 46,2% (CB3) e 56,9% (QS4), com um valor médio de 50,8%. Os dados da literatura indicam uma variação no teor de lípidos entre os

31 e os 68% (m/m) em função da espécie [6]. Apesar do seu elevado conteúdo em lípidos, os ácidos gordos insaturados representaram cerca de 89%, do total dos ácidos gordos (TAG). O ácido linoleico (C18:2 n-6) apresentava maior percentagem relativa, com um valor médio de 46,86±0,05% (217,70 mg/g). O ácido gordo monoinsaturado predominante era o ácido oleico (C18:1 n-9) com valores relativos a variarem entre 34,75% (CB10) e 38,59% (CB9). Os ácidos gordos saturados representavam apenas 10,85±0,04% do total dos ácidos gordos. Sendo os ácidos gordos mais representativos o palmítico e o esteárico, com valores médios de 6,32±0,03% (29,34 mg/g) e 3,79±0,01% (17,62 mg/g), respectivamente.

Tabela 2: Lípidos totais (m/m) e perfil em ácidos gordos (percentagem de ácidos gordos totais) das diferentes parcelas.

| Ácidos Gordos             | Amostra    |            |            |            |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                           | CB3        | CB9        | CB10       | QS4        |
| <b>Lípidos</b><br>(% m/m) | 46,2       | 52,0       | 48,1       | 56,9       |
| <b>C16:0</b>              | 6,17±0,08  | 6,60±0,04  | 6,04±0,10  | 6,46±0,11  |
| <b>C18:0</b>              | 3,81±0,01  | 3,81±0,03  | 3,80±0,02  | 3,75±0,02  |
| <b>SFA</b>                | 10,74±0,06 | 11,17±0,01 | 10,60±0,07 | 10,90±0,10 |
| <b>C18:1</b>              | 38,70±0,08 | 38,94±0,06 | 35,08±0,01 | 37,74±0,14 |
| <b>MUFA</b>               | 39,71±0,08 | 39,91±0,07 | 36,10±0,02 | 38,61±0,11 |
| <b>C18:2 n-6</b>          | 45,74±0,05 | 45,37±0,03 | 49,23±0,06 | 47,01±0,15 |
| <b>C18:3 n-3</b>          | 0,75±0,01  | 0,65±0,00  | 0,81±0,00  | 0,71±0,00  |
| <b>C20:5 n-3</b>          | 0,14±0,01  | 0,19±0,10  | 0,11±0,01  | 0,09±0,08  |
| <b>PUFA</b>               | 49,25±0,06 | 48,62±0,11 | 52,94±0,06 | 50,27±0,07 |
| <b>Sn6</b>                | 48,31±0,05 | 47,73±0,02 | 51,98±0,06 | 49,44±0,16 |
| <b>Sn3</b>                | 0,93±0,01  | 0,89±0,09  | 0,96±0,01  | 0,83±0,10  |

SFA: total de ácidos gordos saturados; MUFA: total de ácidos gordos monoinsaturados; PUFA: total de ácidos gordos polinsaturados; Sn6: total de ácidos gordos da família n-6; Sn3: total de ácidos gordos da família n-3.

A quantidade, e a proporção, de 18:2 n-6 e 18:1 n-9 tem interesse do ponto de vista nutricional, pela ação destes ácidos gordos sobre os mecanismos bioquímicos e fisiológicos. Os valores médios obtidos para os **Índices de Aterogenicidade (IA) = 0,07** e de **Trombogenicidade: (IT) = 0,22** são iguais aos registados no óleo de girassol (IA=0,07 e IT=0,22) e inferiores aos calculados para o azeite com um IA=0,14 e um IT=0,33 (dados não publicados), resultados que apoiam o efeito benéfico destes frutos para a saúde, em particular no que concerne à protecção cardiovascular [7]. Qualitativamente, para a população estudada, o perfil em ácidos gordos parece ser independente, quer da sua origem quer da idade dos povoamentos. Vários autores referem que os ácidos gordos das sementes de *Pinus pinea* L. são idênticos e típicos do género *Pinus*, independentemente da sua origem [6 e 8].

### 3.3. Estereoisómeros da Vitamina E

A Figura 1 mostra os principais estereoisómeros da Vitamina E presentes no óleo do pinhão. Apenas o  $\gamma$ -tocoferol e o  $\alpha$ -tocoferol foram detectados, o  $\gamma$ -tocoferol era o maioritário, variando o seu teor entre 353 e 526 ug/g de lípidos.

Estes valores estão de acordo com os estudos previamente publicados e que confirmam a elevada prevalência do  $\gamma$ -tocoferol nestas sementes [9 e 10].

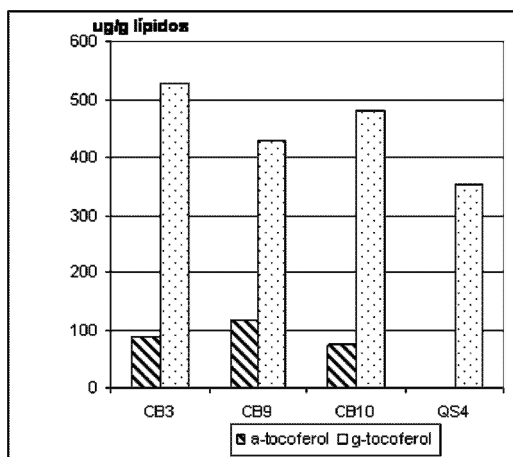


Figura 1: Valores (m/m) dos principais esteroisómeros da Vitamina E nas diferentes parcelas.

### Conclusões:

As sementes analisadas apresentaram um elevado teor lipídico, com uma média de óleo de 50,77%. No que respeita à composição em ácidos gordos os resultados estão de acordo com a literatura consultada. O ácido linoleico foi o ácido gordo predominante seguido do oleico e, com menor percentagem relativa, o palmítico e o esteárico.

Qualitativamente, para as populações das diferentes parcelas, o perfil em ácidos gordos parece ser independente da origem e do estado de desenvolvimento das árvores. Os resultados obtidos mostraram que o pinhão tem um perfil em ácidos gordos que parece ser benéfico na prevenção das doenças cardiovasculares, como o demonstram os valores obtidos para o IA (0,07) e para o IT (0,22). Podendo conter outros constituintes com interesse nutricional e/ou nutracêutico, tais como os tocoferóis. O teor em  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol mostra que o pinhão pode contribuir para um correcto balanço dietético destes compostos.

### Bibliografia

1. UNECE Standard DF-12, Annex 1 Determination of the moisture content for dry produce (nuts), 2002.
2. Bandarra, N. M., Pereira, P. A., Batista, I., Vilela, M. H., 2003. Fatty acids sterols and  $\alpha$ -tocoferol in *Isochrisis galbana*, *Journal of Food Lipids* 10(1):25-34.
3. Santos-Silva, J., Bessa, R. J., Santos-Silva, F. 2002. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77:187-194.
4. Nergiz, C. e Donmez, İ. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 86:365-368.
5. Singanusong, R., Mason R. L., D'arcy, B. R. e Nottingham, S. M. 2003. Compositional changes of Australia-grown Western Schley pecans [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] during maturation. *J Agric Food Chem.*, 51:406-412.
6. Wolff, R. L. e Bayard, C. C. 1995. Fatty acid composition of some pine seeds oils. *JAOCS*, 72:1043-1046.
7. Ros, E. e Mataix, J. 2006. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health (abstract). *British Journal of Nutrition*, 96(S2): 29-35.
8. Nasri, N., Khaldi, A., Fady, B. e Triki, S. 2005. Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and population profiling. *Phytochemistry*, 66:1729-1735.
9. Kornsteiner, M., Wagner, K-H. e Elmadfa, I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98:381-387.
10. Baggi, E. e Karaagaçlı, Y. 2004. Fatty acid and tocopherol patterns of Turkish Pines. *Acta Biologica Cracoviensia*, 46:95-100.



# COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS INTERNAS DA COUVE TRONCHUDA

Pereira, J.A.<sup>1</sup>; Sousa, C.<sup>2</sup>; Ferreres, F.<sup>3</sup>, Valentão, P.<sup>2</sup>; Seabra, R.M.<sup>2</sup>; Andrade, P.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. jpereira@ipb.pt

<sup>2</sup> REQUIMTE/Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal. pandrade@ff.up.pt

<sup>3</sup> Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Dept. Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus Univ. Espinardo, (Murcia) Spain

**Palavras-chave:** couve tronchuda, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, actividade antioxidante.

**Resumo:** A couve tronchuda (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) é uma das couves mais consumidas pelos portugueses, especialmente durante o Inverno, apresentando as folhas (internas e externas) diferenças organolépticas marcadas. No presente trabalho procedeu-se à caracterização química das folhas internas de couve tronchuda, através da identificação e quantificação dos compostos fenólicos e dos ácidos orgânicos que as compõem e avaliou-se o seu potencial antioxidante. Foram identificados e quantificados, por HPLC-DAD-ESI-MS e HPLC/DAD, respectivamente, 17 compostos fenólicos: quercetina 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido, ácido 3-*p*-cumaroilquínico, campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido, campferol 3-*O*-(cafeoil)-soforósido-7-*O*-glucósido, ácido sinapoilglucósido, campferol 3-*O*-(sinapoil)-soforósido-7-*O*-glucósido, campferol 3-*O*-(feruloil)-soforósido-7-*O*-glucósido, campferol 3-*O*-(*p*-cumaroil)-soforósido-7-*O*-glucósido, ácido 4-*p*-cumaroilquínico, ácido sinápico, campferol 3-*O*-soforósido, 3 isómeros de 1,2-di-sinapoilgentiobiose, 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiose, 1,2,2-tri-sinapoilgentiobiose e 1,2'-di-sinapoil-2-feruloilgentiobiose. Foram também identificados e quantificados, por HPLC/UV, sete ácidos orgânicos (ácidos aconítico, cítrico, ascórbico, málico, quínico, chiquímico e fumárico). A actividade antioxidante do extracto aquoso foi aferida pela capacidade para interceptar o radical DPPH e espécies reactivas de oxigénio (radicais superóxido e hidroxilo e ácido hipocloroso), tendo revelado grande efeito protector.

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies do género *Brassica* são dos vegetais mais consumidos no mundo. A sua riqueza em substâncias antioxidantes, vitaminas, minerais e fibra fazem com que desempenhem um papel importante na nutrição humana.

A couve tronchuda (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) é uma couve muito consumida em Portugal, particularmente nos períodos de Outono-Inverno. A fracção fenólica das folhas externas foi recentemente caracterizada por este grupo de investigação [1], tendo sido também demonstrado seu potencial antioxidante [2]. A caracterização fitoquímica e a actividade biológica das sementes foram também já descritas [3], bem como a influência do sistema de produção, biológico e convencional, na sua composição química [4].

Neste trabalho procedeu-se à caracterização fitoquímica das folhas internas de couve tronchuda, através da identificação e quantificação dos compostos fenólicos e dos ácidos orgânicos que as compõem, e avaliou-se o seu potencial antioxidante.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de couve tronchuda foram produzidas sob o modo de produção biológico, na região de Mirandela. Para a caracterização dos compostos fenólicos preparou-se um extracto hidrometanólico [5]. Os ensaios de actividade antioxidante foram realizados com um extracto aquoso, no qual foi feita a quantificação dos diversos compostos [5].

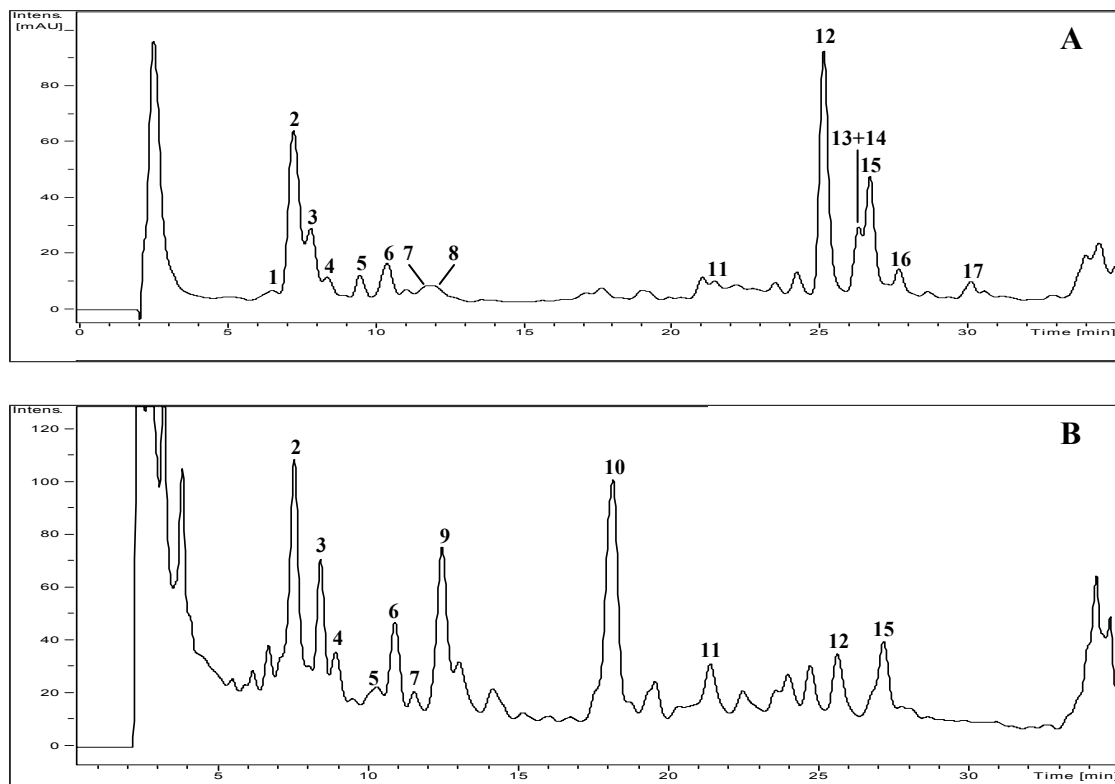
A identificação e quantificação de compostos fenólicos foram efectuadas conforme o descrito por Ferreres *et al.* [5]: os compostos foram identificados por HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> e quantificados por HPLC-DAD.

A identificação e quantificação de ácidos orgânicos foi feita por HPLC-UV, de acordo com Ferreres *et al.* [5].

A actividade antioxidante foi avaliada através de ensaios de intercepção dos radicais DPPH, superóxido e hidroxilo e do ácido hipocloroso [5].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> das folhas internas de couve tronchuda mostrou a existência de 17 compostos fenólicos (Figura 1). O teor de compostos fenólicos no extracto aquoso foi de aproximadamente 1,4 g/kg (Tabela 1), sendo o campferol 3-*O*-soforósido-7-*O*-glucósido (**3**) o composto maioritário (cerca de 21% do total de compostos), seguido do ácido 3-*p*-cumaroilquinico (**2**) (14% do total de compostos, aproximadamente). A 1,2'-dinapoiil-2-feruloilgentiobiose (**16**) é o composto presente em menor concentração (cerca de 1% do total de compostos).



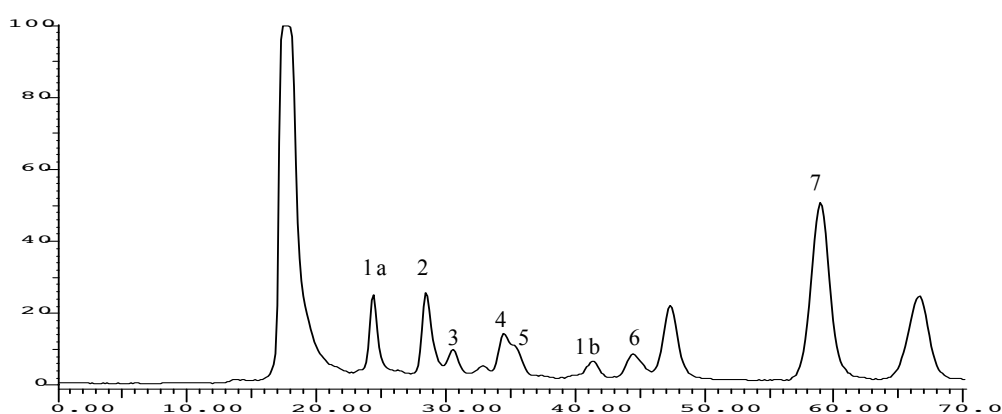
**Figura 1** – Perfil fenólico das folhas internas de couve tronchuda obtido por HPLC-DAD com extracto hidrometanólico (A) e aquoso (B). Detecção a 330 nm. Identidade dos compostos de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição fenólica das folhas internas de couve tronchuda (mg kg<sup>-1</sup>)<sup>a</sup>

|    | <b>Composto fenólico</b>  | <b>Média</b>    | <b>d.p.</b> |
|----|---|-----------------|-------------|
| 1  | Quercetina 3- <i>O</i> -soforósido-7- <i>O</i> -glucósido           | nd              |             |
| 2  | Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico                                  | 189,0           | 1,4         |
| 3  | Campferol 3- <i>O</i> -soforósido-7- <i>O</i> -glucósido            | 287,8           | 8,8         |
| 4  | Campferol 3-(cafeoil)-soforósido-7- <i>O</i> -glucósido             | 120,5           | 3,7         |
| 5  | Ácido sinapoilglucósido   | 25,7            | 0,2         |
| 6  | Campferol 3-(sinapoil)-soforósido-7- <i>O</i> -glucósido            | 180,7           | 5,5         |
| 7  | Campferol 3-(feruloil)-soforósido-7- <i>O</i> -glucósido            | 53,6            | 1,6         |
| 8  | Campferol 3-( <i>p</i> -cumaroil)-soforósido-7- <i>O</i> -glucósido | nd              |             |
| 9  | Ácido 4- <i>p</i> -cumaroilquínico                                  | 126,0           | 0,9         |
| 10 | Ácido sinápico  | 180,1           | 1,1         |
| 11 | Campferol 3- <i>O</i> -soforósido                                   | 100,4           | 3,1         |
| 12 | 1,2-di-Sinapoilgentiobiose  | 51,5            | 0,3         |
| 13 | 1-Sinapoil-2-feruloilgentiobiose                                    | nd              |             |
| 14 | Isómero de 1,2-di-sinapoilgentiobiose                               | nd              |             |
| 15 | 1,2,2'-tri-Sinapoilgentiobiose                                      | 62,9            | 0,4         |
| 16 | 1-2'-di-Sinapoil-2-feruloilgentiobiose                              | 11,4            | 0,1         |
| 17 | Isómero de 1,2-di-sinapoilgentiobiose                               | nd              |             |
|    |   | <b>Σ 1389,6</b> |             |

<sup>a</sup> Os resultados são a média de três determinações. d.p. - desvio padrão, Σ - soma dos compostos fenólicos determinados.

As folhas internas de couve tronchuda apresentaram um perfil em ácidos orgânicos com sete compostos identificados: ácidos aconítico, cítrico, ascórbico, málico, quínico, chiquímico e fumárico (Figura 2). O extracto analisado revelou possuir um elevado teor em ácidos orgânicos (cerca de 23 g/kg de extracto liofilizado), sendo o ácido cítrico o ácido orgânico mais abundante (43% do total de ácidos, aproximadamente), seguido do par ácido málico/ácido quínico (cerca de 28% do total de compostos) (Tabela 2).



**Figura 2** – Perfil em ácidos orgânicos do extracto aquoso das folhas internas de couve tronchuda obtido por HPLC-UV. Detecção a 214 nm. Identidade dos compostos de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2.** Ácidos orgânicos de folhas internas da couve tronchuda (mg kg<sup>-1</sup>)<sup>a</sup>

|              | <i>Ácido orgânico</i> | <b>Mean</b>    | <b>SD</b> |
|--------------|-----------------------|----------------|-----------|
| <b>1</b>     | Aconítico             | 191,1          | 3,7       |
| <b>2</b>     | Cítrico               | 9974,6         | 68,2      |
| <b>3</b>     | Ascórbico             | 6020,1         | 143,4     |
| <b>4 + 5</b> | Málico + Quínico      | 6626,4         | 164,8     |
| <b>6</b>     | Chiquímico            | 35,0           | 1,0       |
| <b>7</b>     | Fumárico              | 407,6          | 1,8       |
|              | <b>Σ</b>              | <b>23254,8</b> |           |

<sup>a</sup> Os resultados são a média de três determinações. d.p. - desvio padrão, Σ - soma dos ácidos orgânicos determinados.

No que respeita à actividade antioxidante, o extracto aquoso das folhas internas de couve tronchuda demonstrou capacidade para interceptar o radical DPPH, de modo dependente da concentração (IC<sub>25</sub> = 1192 µg/ml).

O extracto interceptou o radical superóxido gerado num sistema enzimático contendo xantina oxidase, sendo esse efeito dependente da concentração (IC<sub>50</sub> = 351 µg/ml). Adicionalmente, apresentou alguma capacidade para inibir esta enzima (IC<sub>10</sub> = 273 µg/ml). A capacidade para interceptar o radical superóxido foi confirmada quando este radical foi gerado por um sistema químico (IC<sub>25</sub> = 101 µg/ml). Assim, a actividade exibida pelo extracto de folhas internas no ensaio enzimático deve-se à capacidade para interceptar o radical superóxido e para inibir a xantina oxidase.

As folhas internas de couve tronchuda revelaram uma potente capacidade para interceptar o radical hidroxilo gerado num sistema de Fenton, de modo dependente da concentração (IC<sub>25</sub> = 27 µg/ml). No ensaio realizado sem ácido ascórbico não demonstraram efeito pró-oxidante. Adicionalmente, no ensaio realizado sem EDTA observou-se uma fraca capacidade para quelatar o ferro.

Relativamente ao dano causado pelo ácido hipocloroso o extracto aquoso de folhas internas revelou uma actividade protectora reduzida.

Os resultados obtidos mostram que as folhas internas da couve tronchuda podem constituir uma fonte de compostos, nomeadamente flavonóides e ácidos orgânicos, com acção benéfica na saúde humana. Os extractos delas obtidos possuem grande poder antioxidante, sugerindo que o consumo de couve tronchuda pode ser importante ao nível da prevenção de doenças que envolvam radicais livres.

### **Agradecimentos**

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Projecto POCI/AGR/57399/2004).

### **Referencias**

- [1] – Ferreres, F.; Valentão, P.; Llorach, R.; Pinheiro, C.; Cardoso, L.; Pereira, J. A.; Seabra, R.M., Andrade, P. – J. Agric. Food Chem., **53** (2005) 2901-2907.
- [2] – Vrchovska, V.; Sousa, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Pereira, J. A.; Seabra, R.M.; Andrade P. B. - Food Chem. **98** (2006) 416-425.
- [3] – Ferreres, F.; Sousa, C.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Pereira, J. A.; Andrade, P.B. - Food Chem. **101** (2007) 549-558.
- [4] – Sousa, C.; Valentão, P.; Rangel, J.; Lopes, G.; Pereira, J. A.; Ferreres, F.; Seabra, R.M.; Andrade P. B. – J. Agric. Food Chem. **53** (2005) 9128-9132.
- [5] – Ferreres, F.; Sousa, C.; Vrchovska, V.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Seabra, R.M.; Andrade P. B. – Eur. Food Res. Technol. **222** (2006) 88-98.

## CONSUMO DE PEIXE: EFEITO NA PREVENÇÃO DA DOENÇA CARDIOVASCULAR

*Bandarra, N.M.<sup>1</sup>, Monteiro, M.<sup>1</sup>, Parreira, R.<sup>1</sup>, Paulo, M.C.<sup>1</sup>, Andrade, A.M.<sup>1</sup>, Gisladottir, E.<sup>2</sup>,  
Martinez, J. A.<sup>3</sup>, Parra, L.<sup>3</sup>, Kiely, M.<sup>4</sup> and Thorsdottir, I.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca INIAP/IPIMAR, Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal. Tel.: +351-21-3027000; fax: +351-21-3015948.

E-mail: narcisa@ipimar.pt

<sup>2</sup> Unit for Nutrition Research, Landspítali-University Hospital, Iceland

<sup>3</sup> The Department of Physiology and Nutrition, University of Navarra, Spain.

<sup>4</sup> Department of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Ireland.

### Objectivo

Avaliar o efeito na prevenção da doença cardiovascular de dietas ricas em peixe magro (bacalhau fresco) e peixe gordo (salmão) com restrição calórica em 30 %. O perfil de ácidos gordos da membrana dos eritrócitos foi usado como biomarcador e os resultados obtidos foram ainda comparados com os de uma dieta padrão que não incluía peixe.

### Métodos

Recrutaram-se voluntários saudáveis de 3 países europeus, Islândia (87), Irlanda (43) e Espanha (78) segundo os seguintes critérios de inclusão: idade entre 20-40 anos, aparentemente saudáveis, com índice de massa corporal entre 28-32 kg/m<sup>2</sup>. Alguns dos critérios de exclusão foram a ingestão nos 2 meses prévios de suplementos com cálcio, Vitamina D, ácidos gordos do tipo omega-3, insulina e drogas anti-inflamatórias ou hipertensivas.

O sangue total foi fraccionado, tendo os eritrócitos sido liofilizados para análise de ácidos gordos. Para derivatizar apenas a fracção fosfolipídica, seguiu-se um método de trasesterificação alcalina selectiva durante uma hora. O perfil de ácidos gordos foi determinado por cromatografia em fase gasosa com detecção com ionização de chama. A identificação dos ésters metílicos de ácidos gordos foi feita por comparação com os tempos de retenção de padrões cromatográficos. Os dados foram analisados estatisticamente por análise paramétrica ( $p < 0,05$ ) com o software Statistica 6.0, por teste t para amostras dependentes, ANOVA para comparação multigrupos com teste de Tukey.

### Resumo de resultados

A dieta de salmão foi responsável pelo aumento significativo do total de ácidos gordos n-3 ( $p < 0,001$ ), em particular do EPA (ácido eicosapentaenóico,  $p < 0,001$ ) e DHA (ácido docosahexaenóico,  $p < 0,001$ ) e pela diminuição dos ácidos gordos do tipo n-6 ( $p < 0,001$ ), sendo o AA (Ácido araquidónico) o ácido gordo maioritariamente responsável por este decréscimo.

A dieta de bacalhau aumentou significativamente o nível do DHA ( $p < 0,001$ ), mostrando que este ácido gordo pode ser um bom marcador do consumo de pescado, mesmo em espécies com baixo teor de gordura.

Uma dieta de 2 meses sem inclusão de pescado, promoveu um aumento significativo do AA ( $p < 0,001$ ) com a conseqüente diminuição dos ácidos gordos n-3 ( $p < 0,001$ ).

### Conclusão

Estes resultados sugerem que o consumo de peixe tem efeitos benéficos na composição das membranas dos eritrócitos contribuindo para a prevenção da doença cardiovascular.

# ESTUDO DO APROVEITAMENTO ECONÓMICO DA FIBRA DE *Beta vulgaris*. AVALIAÇÃO SENSORIAL DE NOVOS SUPLEMENTOS DIETÉTICOS FUNCIONAIS

Andrade, A.L.<sup>1</sup>, Alves, M.G.<sup>1</sup>, Teves, Z.<sup>2</sup>, Lima, E.<sup>1,\*</sup>, Baptista, J.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD)  
Rua da Mãe de Deus, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

<sup>2</sup> SINAGA - Sociedade de Indústrias Agrícolas Açoreanas, S.A.

Rua de Lisboa, 75, 9500-216 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

\* Tel +351-296 650 172 Fax +351-296 650 171 e-mail: [elis@notes.uac.pt](mailto:elis@notes.uac.pt) ou [baptista@notes.uac.pt](mailto:baptista@notes.uac.pt)

**Palavras-chave:** análise sensorial, alimentos funcionais, *Beta vulgaris*, fibras alimentares

**Resumo:** Estudo do aproveitamento das fibras de *Beta vulgaris*, visando a potencial implementação de novos produtos alimentares na indústria açoriana, tendo por base a análise sensorial.

## 1. INTRODUÇÃO

A polpa de beterraba sacarina (*Beta vulgaris* L.), subproduto da indústria açucareira, é geralmente rejeitada ou aproveitada para a alimentação do gado, procedimento que subavalia o seu valor como fonte rica em fibras e proteínas, que podem ser aproveitadas na fabricação de alimentos funcionais com interesse comercial e terapêutico para a alimentação humana.

Tendo como finalidade o aproveitamento da fibra da polpa de beterraba produzida pela empresa SINAGA, S.A., com sede na Ilha de S. Miguel (Açores), traçaram-se os seguintes objectivos: (a) desenvolvimento de uma metodologia de extracção tendo em vista um elevado rendimento, (b) estudo da possível valorização da fibra extraída, solúvel e insolúvel, pela sua adição ao leite e ao iogurte, respectivamente, sendo as propriedades organolépticas dos novos produtos avaliadas por um painel sensorial e (c) estudo de viabilidade económica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Extracção da fibra de *B. vulgaris* para fins alimentares

A amostra de polpa de *B. vulgaris* (congelada à temperatura de -18 °C) foi cedida pela Empresa SINAGA.

Após lavagem, a polpa escorrida foi pesada e homogeneizada, usando álcool etílico a 96%, durante um minuto. O produto homogeneizado foi lavado com álcool etílico a 96%, até obtenção de um filtrado incolor. Após secagem da fibra a 60 °C, durante 5 horas, e a 35 °C, por um período de 20 horas, procedeu-se à sua pesagem [1,2].

### 2.2 Análise sensorial

Recorrendo a um painel de provadores, constituído por elementos de diferentes grupos etários, foram realizadas, na sala de provas do DCTD, três análises sensoriais para: (a) comparação do sabor e da viscosidade entre o leite enriquecido com fibra de *B. vulgaris* e o leite enriquecido com fibra à venda no mercado, (b) apreciação do sabor do leite enriquecido

com fibra de *B. vulgaris* e aromatizado e (c) apreciação do sabor e da textura do iogurte enriquecido com fibra insolúvel de *B. vulgaris* e aromatizado.

Para a realização da primeira prova usou-se leite meio gordo enriquecido com fibra (1 g de fibra/100 mL de leite), à venda no mercado local, e leite meio gordo, da mesma marca, ao qual se adicionou, na proporção anterior, a fibra de *B. vulgaris*. Esta preparação foi filtrada, após agitação manual, e a fibra insolúvel, retida no filtro, foi guardada no frio para posterior aplicação. Na segunda prova, a cada 100 mL de filtrado foram adicionados, respectivamente, aromas de groselha (200 µL), de baunilha (200 µL), de ananás (300 µL), de morango (200 µL) – da Rimar – e de chocolate (600 µL), da Global. À solução aromatizada com morango foram ainda adicionadas 60 mg de adoçante (aspartamo), da Chave d'Ouro Cafés.

Para a realização da terceira prova produziram-se iogurtes, com três concentrações diferentes de fibra insolúvel (0.5%, 1% e 2%), usando-se leite proveniente de uma lavoura açoriana, iogurte natural da Yoçor, aroma de groselha ou de ananás e açúcar da Sinaga; para cada litro de leite pasteurizado, usou-se 1 iogurte, 40 g de açúcar e aroma. A pasteurização do leite foi feita em banho-maria, à temperatura de 60 °C, durante 35 minutos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem de fibra obtida a partir de *B. vulgaris*, pelo processo de extracção escolhido, foi de 8.5, tendo por base o peso da fibra antes e após secagem (461 g e 39 g, respectivamente).

A fibra extraída foi utilizada para fins alimentares, como o enriquecimento do leite com fibra do tipo solúvel e o fabrico de iogurte com fibra do tipo insolúvel, tendo-se realizado as seguintes análises sensoriais:

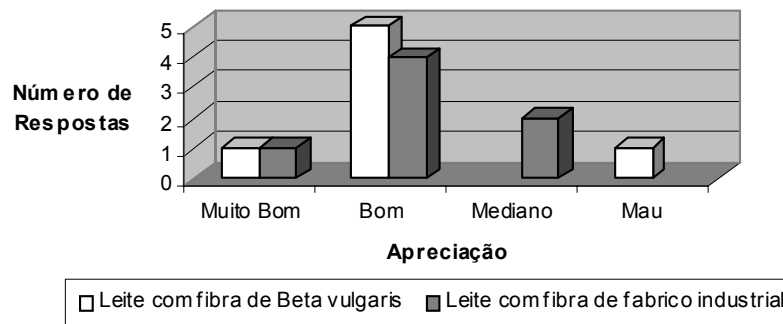
#### **I. Leite enriquecido com fibra de *B. vulgaris* versus leite comercial enriquecido com fibra (comparação do sabor e da viscosidade). Aromatização do leite enriquecido com fibra de *B. vulgaris* (apreciação do sabor)**

Quanto aos leites enriquecidos com fibra, a maioria dos provadores considerou as duas amostras com bom sabor (Figura 1) e todos atribuíram um bom teor de viscosidade ao leite com adição de fibras de *B. vulgaris* (Figura 2).

A partir das sugestões efectuadas nas folhas de registo da prova sensorial, verificou-se que três provadores encontraram diferenças entre as duas amostras de leite, atribuindo um maior sabor a fibras ao leite enriquecido com a fibra de *B. vulgaris*. Constatou-se, ainda, que os provadores que não são apreciadores de leite natural foram os que mais gostaram deste leite. Este facto deve-se, possivelmente, à alteração significativa do sabor do leite pelas fibras de *B. vulgaris*; alguns provadores mencionaram que o sabor se assemelhava ao dos cereais. Relativamente ao leite comercial enriquecido com fibras, três provadores afirmaram não encontrar diferenças relativamente ao leite normal sem adição de fibras.

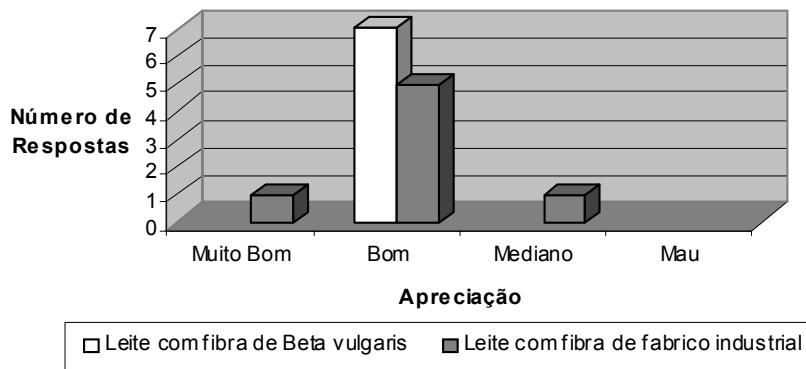
A aromatização do leite em análise, conforme também sugerido nas folhas de registo da prova sensorial, foi uma boa opção, dado que todos apreciaram a medida (Figura 3). No entanto, as sugestões dos provadores transmitem que os leites aromatizados com groselha e chocolate deveriam ter sido mais concentrados em aroma e que o leite com aroma de morango estava doce. Este último leite foi unanimemente considerado como muito bom (Figura 3), talvez pelo facto de ter sido a única preparação com adição de adoçante.

**Sabor - Leite com Fibras de *Beta vulgaris* versus Leite com Fibras de Fabrico Industrial**



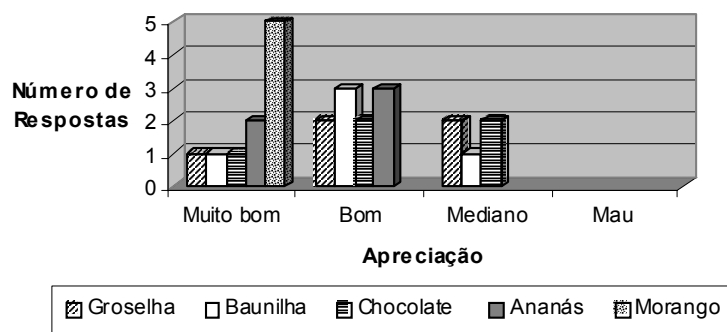
**Figura 1** – Comparação do sabor entre o leite com fibras de *B. vulgaris* e o leite com fibras comercializado no mercado local

**Viscosidade - Leite com Fibras de *Beta vulgaris* versus Leite com Fibras de Fabrico Industrial**



**Figura 2** – Comparação de viscosidade entre o leite com fibras de *B. vulgaris* e o leite com fibras comercializado no mercado local

**Sabor - Leite Aromatizado e Enriquecido com Fibra de *Beta vulgaris***



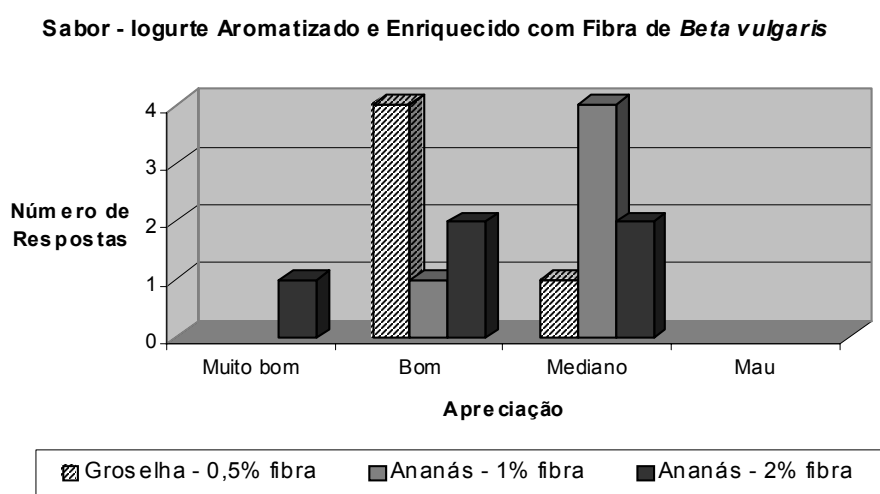
**Figura 3** – Apreciação do sabor do leite enriquecido com fibras de *B. vulgaris* e aromatizado



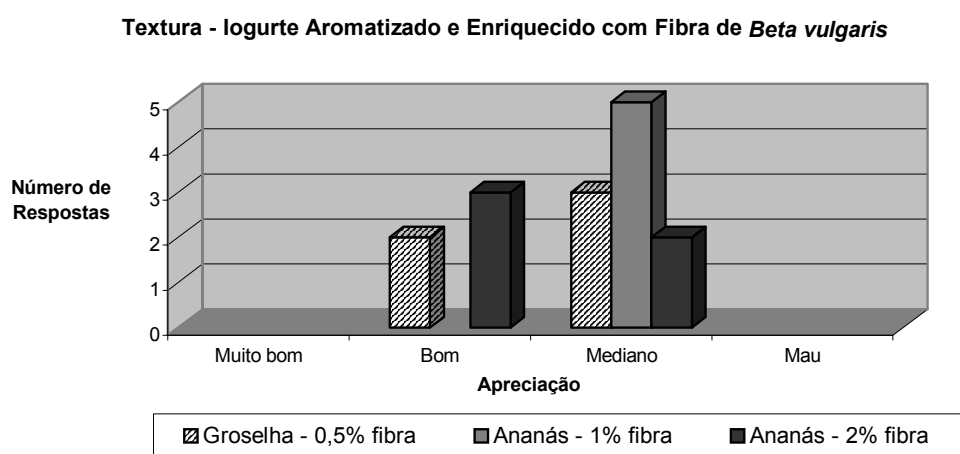
## II. Apreciação do sabor e da textura do iogurte enriquecido com fibra de *B. vulgaris* e aromatizado

Da análise dos resultados (Figuras 4 e 5) concluiu-se que houve uma aceitação relativamente boa dos iogurtes. Os provadores referiram que estes estavam ligeiramente ácidos e que a sua textura devia ser melhorada com uma adequada incorporação das fibras. Afirmaram, ainda, que os iogurtes estavam poucos doces ou mesmo demasiado amargos (nomeadamente o iogurte de ananás rico em 1% de fibra).

Verificou-se que nenhum provador conseguiu diagnosticar o aroma de groselha, todos identificaram o aroma de ananás do iogurte rico em 1% de fibra e dois detectaram o aroma de ananás do iogurte rico em 2% de fibra.



**Figura 4** – Apreciação do sabor do iogurte enriquecido com fibras de *B. vulgaris* e aromatizado



**Figura 5** – Apreciação da textura do iogurte enriquecido com fibras de *B. vulgaris* e aromatizado

As críticas feitas quanto à textura devem estar relacionadas com o estado de liquefacção em que se encontrava o iogurte, o que dificultou a boa incorporação das fibras. Relativamente à acidez dos iogurtes, este facto pode dever-se à transformação da lactose em ácido láctico durante o processamento do iogurte e à ausência da adição de lactose, como acontece nos iogurtes comerciais.

#### 4. ESTUDO DA VIABILIDADE ECONÓMICA

Em 2006 a fábrica da SINAGA produziu um excedente de 7550 toneladas de polpa de *B. vulgaris*, que foi vendido aos produtores agrícolas por 0.02 €/Kg. Este excedente poderá ser grandemente aumentado, face ao objectivo de duplicação da produção de beterraba até ao final da década.

Considerando um teor de 8.50% de fibra, a venda desta por 2.30 €/Kg (preço praticado por alguns produtores de fibra) originaria um lucro bruto anual de 9.78 superior à venda da polpa.

#### 5. CONCLUSÕES

A presença, nas prateleiras dos supermercados, de produtos alimentares enriquecidos com fibras, como o leite, o iogurte, a bolacha, a farinha, tem aumentado significativamente nos últimos tempos. Este facto deve-se à divulgação dos profissionais de saúde, que vêm na alimentação um factor fundamental para a prevenção e cura de determinadas doenças. Outro factor, que tem, também, um impacto forte nos consumidores é a publicidade feita pelos produtores de alimentos ricos em fibras.

Tendo em conta o incremento desejável de fibras na dieta humana, face às características únicas destes nutrientes, a fibra extraída da polpa de *Beta vulgaris* foi aproveitada, neste estudo, para o enriquecimento do leite e do iogurte, verificando-se uma boa aceitabilidade sensorial dos produtos confeccionados.

O estudo feito a nível de viabilidade económica mostra que associar as fibras provenientes de um excedente da indústria açucareira açoriana ao leite, que é o produto de maior expressão na região, seria, ainda, uma forma de dinamizar e beneficiar dois sectores de grande importância económica nos Açores.

#### Referências

- [1] – Ö. Özboy, H. Köksel – Utilization of sugar beet fiber in the production of high fiber bread, *Zuckerindustrie* **124** (1999) 712-715
- [2] – Z. Teves – *Obtenção de fibras de polpa de Beta vulgaris destinada a fins alimentares*, Relatório, Universidade dos Açores, Açores (2004).

# ESTUDO REOLÓGICO SOBRE A FIBRA DE *Psyllium* COMO AGENTE GELIFICANTE

Temudo, S.; Nunes, M.C.; Batista, A.P.; Raymundo, A.\*

Centro de Investigação em Eng<sup>a</sup> Alimentar e Biotecnologia – Instituto Piaget, ISEIT de Almada.  
Quinta da Arreínela de Cima, 2800-305 Almada. araymundo@almada.ipiaget.org

**Palavras chave:** psyllium, fibra, mel, gel, reologia.

**Resumo:** O psyllium é uma mucilagem resultante das cascas das sementes da planta *Plantago psyllium* L., sendo composta por fibra solúvel e insolúvel. Este polissacárido tradicionalmente usado como fibra dietética na regulação do tracto intestinal, pode ser considerado um novo ingrediente funcional com boas propriedades gelificantes. Este trabalho insere-se num projecto que visa o desenvolvimento de géis enriquecidos com mel e fibra, procurando contribuir para o aumento do consumo destes produtos com benefícios evidentes para a saúde. O estudo das variáveis de processamento dos géis foi efectuado recorrendo à metodologia das superfícies de resposta (RSM). Consideraram-se como variáveis independentes o tempo (4,5 a 55,5 min) e a temperatura (40° a 96°C), e como variáveis dependentes, os parâmetros de textura (firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade) e cor (a\*, b\* e L\*). Foi também realizado o estudo do efeito da concentração (2,0%, 2,5% e 3,0%) e granulometria (inteiro e moído) do psyllium, nas propriedades mecânicas dos géis. A textura foi caracterizada num texturómetro, recorrendo à análise de perfil de textura (TPA) e a cinética de gelificação foi caracterizada numa sequência de testes (varrimento em temperatura, tempo e frequência) em regime dinâmico, num reómetro de tensão controlada. A optimização das condições de processamento permitiu correlacionar o tempo e a temperatura de processamento dos géis, com os seus parâmetros de textura e cor. A temperatura foi o factor determinante no aumento dos parâmetros de textura e na definição da cor dos géis em geral. Para além disso obtiveram-se géis com características comerciais aceitáveis, mesmo a baixas temperaturas, que é um resultado relevante na medida em que permite preservar as propriedades funcionais do mel. A redução da granulometria de psyllium, melhorou as características gelificantes deste polissacárido e os géis obtidos (com psyllium moído) revelaram propriedades viscoelásticas com elevado potencial para a obtenção de géis a nível industrial.

## 1. INTRODUÇÃO

A evolução constante que se verifica nos estilos de vida e necessidades dos consumidores, que procuram cada vez mais alimentos alternativos aos convencionais, implica uma permanente adequação das indústrias aos novos hábitos alimentares. Os alimentos funcionais surgem com a recente evolução do conceito de alimentação, em que esta é considerada ter um papel activo na promoção da saúde do consumidor.

Este trabalho insere-se num projecto mais amplo, que visa o desenvolvimento de géis enriquecidos com mel e fibra, como produtos com benefícios evidentes para a saúde humana. Psyllium, é o nome vulgarmente usado para designar os diversos membros das plantas do género *Plantago*, dos quais se utilizam comercialmente as sementes para a extracção das cascas, com o objectivo da produção de mucilagem [1]. Este é particularmente utilizado como fibra dietética na alimentação humana e também na indústria farmacêutica, com reconhecidas propriedades terapêuticas na regulação do funcionamento do tracto intestinal.

De facto, este polissacárido apresenta elevado teor em fibra solúvel [2], cerca de 79,6%, e 12,4% em fibra insolúvel. Este polissacárido apresenta uma elevada capacidade de retenção de água, que lhe confere boas propriedades gelificantes e permite que seja usado em diversas situações como agente gelificante na indústria alimentar. Tem para além disso, a particularidade de gelificar mesmo a baixas temperaturas, o que é vantajoso perante a

necessidade de utilização das temperaturas mais elevadas na preparação das geleias e dos géis tradicionalmente obtidos a partir das gomas e pectinas. O processamento dos géis a uma temperatura mais baixa (50°C) permitiu utilizar o psyllium como gelificante do mel, que tem as suas propriedades funcionais alteradas a temperaturas mais altas.

Em outros trabalhos paralelos, estudou-se a possibilidade de utilizar o psyllium em sistemas gelificantes mistos (*e.g.* em misturas com goma xantana). No presente trabalho, utilizou-se o psyllium como único agente gelificante.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Para a elaboração dos géis foram utilizados como ingredientes o mel, psyllium e própolis.

O mel foi o ingrediente maioritário dos géis, sendo o principal responsável pelo seu sabor. Foi utilizado o mel de rosmaninho, da região de Belmonte, que apresentava cor laranja, translúcida, e com um escoamento viscoso, sem a presença de cristalização. O ingrediente utilizado como agente gelificante nos géis, foi a fibra das cascas de psyllium 100% puro, da Solgar (U.S.A). O extracto comercial de própolis Montana Mel a 30% (em etanol a 70%) veio enriquecer os géis nas suas propriedades funcionais.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Elaboração do gelificado de mel**

Os géis preparados para o estudo da optimização das condições de processamento apresentam a seguinte composição: mel (60%), psyllium (2,5%) e água (37,5). Para o estudo da concentração e granulometria de psyllium, utilizou-se a formulação acima referida, com as concentrações de psyllium de 2,0%, 2,5% e 3,0%, na granulometria inteira e moída. O psyllium moído foi obtido num moinho eléctrico.

O procedimento de preparação dos géis foi o seguinte: adicionou-se o psyllium à água para hidratar durante 5 minutos, juntou-se ao mel e aqueceu-se a mistura em banho-maria até atingir 50°C e manteve-se a esta temperatura durante 15 minutos. Os géis destinados à optimização do processamento, foram elaborados de acordo com os intervalos de tempo e temperatura definidos na matriz CCRD. A solução foi agitada mecanicamente e a temperatura foi controlada por um termómetro ligado à placa de aquecimento. Os géis conservaram-se à temperatura de refrigeração, em frascos de vidro com 90 ml de capacidade, com a excepção dos géis destinados à caracterização feita no reómetro, que foram colocados no prato do seu sistema sensor logo após os 15 min de aquecimento. Todas as formulações foram feitas e analisadas em triplicado.

#### **2.2.2. Análise instrumental da Textura, Cor e Comportamento viscoelástico dos géis**

Para a determinação instrumental da textura usou-se um Texturómetro TA-XT2i da Stable Micro Systems, tendo-se efectuado o teste de análise de perfil de textura (TPA), também designado por teste das duas dentadas. Para tal, usou-se uma sonda cilíndrica acrílica de 38 mm de diâmetro, deslocando-se à velocidade de 2 mm/s, que realizou duas penetrações de 10 mm de profundidade, com um intervalo de 5 segundos entre as dentadas. Os parâmetros de textura obtidos foram a firmeza, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosidade e masticabilidade.

A determinação da cor como parâmetro resultante da optimização do processamento, foi feita num colorímetro (Minolta CR-300), sendo os resultados referem-se à média de 3 réplicas realizadas em cada uma das 3 amostras dos géis de cada um dos 12 tratamentos da matriz CCRD.

Para a caracterização do comportamento viscoelástico dos géis, foi usado um reómetro de tensão controlada (RS-300, *Haake*, Germany) com um sistema sensor de pratos paralelos serrados (35 mm Ø) e uma distância entre pratos de 1,0 mm. Foi realizada a seguinte sequência de testes reológicos em regime dinâmico: varrimento em temperatura de 50° a 5°C; varrimento em tempo a 5°C (12 horas); varrimento em frequência (0,01 a 150 rad/s); varrimento em temperatura de 5° a 95°C, seguida de varrimento em temperatura de 95° a 5°C.

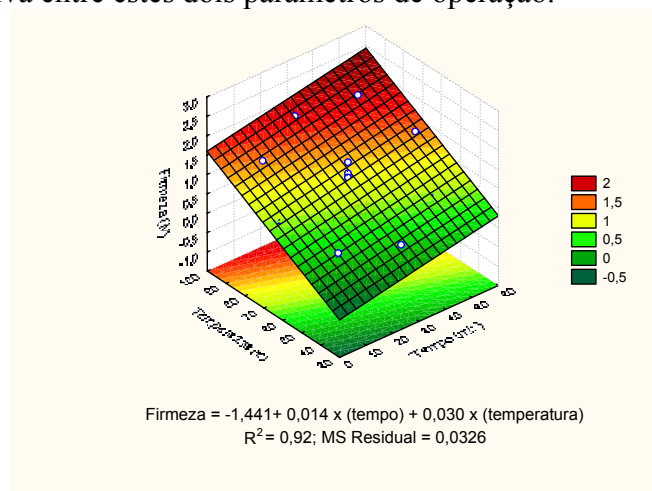
### 2.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo de optimização das condições de tempo e temperatura de processamento dos géis, foi usada a metodologia das superfícies de resposta (RSM), recorrendo ao *software* Statistica (versão 6.0, Statsoft, Inc., USA). Esta metodologia permitiu estudar os efeitos lineares e quadráticos, e as correlações existentes entre as variáveis. Consideraram-se como variáveis independentes o tempo (4,5 a 55,5 min) e a temperatura (40° a 96°C) e as variáveis dependentes os parâmetros de textura (firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade) e cor ( $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ ). O ajustamento do modelo aos pontos experimentais foi dado pelos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e quadrados médios residuais (QMRE). Recorreu-se à análise de variância ANOVA, para fazer a comparação dos resultados da análise instrumental da textura e verificar a existência de diferenças significativas. Foi usado o teste Scheffé ( $p < 0,05$ ), Post-Hoc Comparisons, no *software* Statistica 6.0 (StatSoft).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Optimização das Condições de Tempo e Temperatura de Processamento dos géis

Na Figura 1 representa-se a superfície de resposta e a respectiva equação de 2º grau, que relacionam a firmeza com o tempo e temperatura de processamento. Verifica-se que ambas as variáveis independentes afectam positiva e linearmente a firmeza dos géis, não havendo interacção significativa entre estes dois parâmetros de operação.



**Figura 1** – Superfície de resposta que relaciona o tempo e temperatura de processamento dos géis, com a sua firmeza.

Apesar de o tempo de aquecimento, também ter apresentado efeito significativo nos parâmetros de textura dos géis, a temperatura foi sem dúvida aquela que apresentou efeito mais significativo na generalidade dos parâmetros de textura e nos parâmetros de cor avaliados.

De uma forma geral, as relações matemáticas encontradas para os parâmetros de textura e de cor apresentaram um bom ajuste, dado pelo coeficientes  $R^2$  e QMRE. Exceptuam-se os

parâmetros  $a^*$  (tonalidade vermelha) e  $L^*$  (tonalidade mais clara ou escura) da cor, que não apresentaram correlação com o tempo e com a temperatura de aquecimento dos géis.

### **3.2. Efeito da concentração e granulometria do psyllium nas propriedades mecânicas dos géis**

A firmeza dos géis preparados com 2,5% e 3,0% de psyllium moído, praticamente duplicou, em relação aos géis psyllium inteiro ( $p < 0,05$ ), por comparação dos valores com o teste *Scheffé* da ANOVA.

A avaliação das propriedades viscoelásticas dos géis durante o processo de gelificação, com a fibra moída e na sua forma comercial, permitiu verificar que os géis obtidos apresentam características reológicas muito interessantes, quando comparados com outro tipo de agentes gelificantes. A reprodutibilidade dos resultados, no caso dos géis com psyllium inteiro, é reduzida, devido à heterogeneidade resultante do elevado tamanho das partículas de psyllium na sua forma comercial.

A sequência de testes realizada permitiu verificar que o gel atingiu o estado de pseudo-equilíbrio num curto período de tempo de 4 a 5 horas. O espectro mecânico mostrou haver o comportamento típico de gel fraco por parte dos géis com psyllium moído. Foi ainda possível observar que a transição gel-sol ocorreu entre as temperaturas de 90° a 95°C e durante o aquecimento de 5°C a 95°C. No reaquecimento de 95°C a 5°C, verificou-se um comportamento termorreversível, acrescido de um reforço da estrutura do gel.

## **4. CONCLUSÃO**

A otimização das condições de processamento, na textura e cor dos géis, permitiu estabelecer correlações entre as variáveis independentes e dependentes, e mostrou ser a temperatura o parâmetro que apresenta influência mais evidente no conjunto das variáveis estudadas.

A análise do perfil de textura (TPA), permitiu verificar que a redução do tamanho das partículas de psyllium, levou a um aumento em geral, dos valores dos parâmetros de textura dos géis.

Estes resultados permitiram concluir que o psyllium apresenta elevado potencial gelificante quando sujeito a temperaturas acima dos 50°C, que pode ser explorado em situações em que os restantes ingredientes não sejam alterados mediante o processamento a temperaturas mais altas. Mesmo a baixas temperaturas, foi possível obter géis de mel com características comerciais aceitáveis e propriedades mecânicas idênticas às de outros produtos comerciais. A redução do tamanho de partículas da fibra tem vantagens, que se manifestam por uma melhoria na textura e comportamento reológico dos géis, que terá impacto directo da percepção sensorial dos mesmos.

## **Referências**

[1] Hanson, C.V., Oelke, E.A., Putnam, D.H., & Oplinger, E.S. (1992). Psyllium. Em: *Alternative Crops Manual*. University of Minnesota; [2] Yu, L., Perret, J., Parker, T., & Allen, K. (2003). Enzymatic modification to improve the water-absorbing and gelling properties of psyllium. *Food Chemistry*, 82, 243-248.

# LACTIC ACID BACTERIA FROM BLACK AND GREEN OLIVES ARE A RICH SOURCE OF BACTERIOCIN PRODUCERS

\*Todorov, S.D.<sup>1</sup>, Vaz-Velho, M.<sup>2</sup>, Dicks, L.M.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Stellenbosch University, Stellenbosch, 7602, South Africa  
Tel: +27-21-8085850; Fax: +27-21-8085846; e-mail: todorov@sun.ac.za

<sup>2</sup>Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal  
Tel: +351 258 819700; Fax: +351 258 827636; email: mvazvelho@estg.ipvc.pt

**Key words:** *L. plantarum*, *E. faecium*, *L. mesenteroides*, olives, bacteriocins

**Summary:** Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* ST23LD and ST341LD, *Enterococcus faecium* ST311LD and *Leuconostoc mesenteroides* ST33LD were isolated from the brine of spoiled black olives. The bacteriocins produced by all four strains inhibited the growth of Gram-positive bacteria (*E. faecalis*, *L. casei* and *S. pneumoniae*), but also *E. coli* and *P. aeruginosa*. Strain ST23LD produced two bacteriocins (ST23LDA and ST23LDB of approximately 3.0 and 14.0 kDa, respectively), with a combined maximum level of activity of 25600 AU/ml after 18h of growth. The same level of activity was recorded for bacteriocin ST341LD (approximately 3.0 kDa), but after 16h. Bacteriocins ST311LD (ca. 2.3 kDa) and ST33LD (ca. 2.7 kDa) were produced at much lower levels (6400 AU/ml), and only after 20h of growth. Bacteriocin activity was destroyed after treatment with proteolytic enzymes and Triton X-100 and Triton X-114, but not when treated with  $\alpha$ -amylase, SDS, Tween 20, Tween 80, urea and EDTA, or when heated for 20 min at 121°C. Cells of *L. casei* LHS did not lyse when treated with the bacteriocins, suggesting that the mode of action is bacteriostatic. Bacteriocins ST23LD, ST341LD and ST33LD remained at the same level of activity for 6h at pH < 4.0. However, the activity of bacteriocin ST311LD decreased by 50% within 2h at pH 4.4. The possibility of the bacteriocin adsorbing to the producer cell and proteolytic degradation is unlikely.

## 1. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria play an important role in food fermentations and have many health and nutritional benefits. A number of antimicrobial compounds are produced during fermentation, which includes organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide and bacteriocins. Many papers have been published describing the antagonistic activity of bacteriocins against spoilage and pathogenic bacteria isolated from food [1]. Only a few bacteriocins produced by lactic acid bacteria from olives have been described [2-4].

In this study we report on two bacteriocins produced by *L. plantarum* ST23LD and ST341LD, a bacteriocin produced by *E. faecium* ST311LD and a bacteriocin produced by *L. mesenteroides* ST33LD. The four bacteriocins were active against Gram-positive bacteria, but also *P. aeruginosa* and *E. coli*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1. Isolation and screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria:** Lactic acid bacteria isolated from spoiled olive brine with fungal growth were tested for bacteriocin production by using the triple-agar layer method. Colonies with the largest inhibition zones were isolated and re-streaked to obtain pure cultures. Antimicrobial activity was confirmed by using the agar-spot test method, as described by Todorov *et al.* [5]. The indicator strains are listed in Table 1.

**2.2. Identification of strains:** The bacteriocin-producing strains were identified according to their physiological and biochemical characteristics, as described by Stiles and Holzapfel [6].

Sugar fermentation reactions were recorded by using the API50CHL and API20E test strips (Biomérieux). Further identification was by DNA banding patterns generated with primers specific for *L. plantarum*, *E. faecalis* and *L. mesenteroides*.

**2.3. Molecular size of the bacteriocins:** Method for determination of small proteins described by Schägger and von Jagow [7] and modified by Von Mollendorff *et al.* [8] was used.

**2.4. Effect of enzymes, temperature, pH, surfactants and protease inhibitors on the bacteriocins:** Effect of Proteinase K, Pronase, papain, pepsin and trypsin,  $\alpha$ -amylase and catalase, SDS, Tween 20, Tween 80, urea, Triton X-114, Triton X-100 and EDTA were tested. The effect of pH (from 2.0 to 12.0) and temperature (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 and 121°C) were tested.

**2.5. Cell lysis:** The ability of the bacteriocins to cause cell lysis was determined adding 20 ml of a bacteriocin-containing filter-sterilized (0.22  $\mu$ m) supernatant (pH 6.0) to 100 ml of *L. casei* L HS cells in early exponential phase ( $OD_{600nm} = 0.3$ ). The optical density ( $OD_{600nm}$ ) of the culture was determined every hour for 11h.

**2.6. Adsorption studies:** The ability of a bacteriocin to adsorb to its producer strain was determined by using the method of Yang *et al.* [9].

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The total population of the lactic acid bacteria in the olive brine was between  $1.8 \times 10^3$  cfu/ml and  $6.1 \times 10^5$  cfu/ml, depending on the degree of spoilage. Samples with more fungal growth had higher bacterial counts. From a total of 25 colonies screened for bacteriocin production against *L. casei* LHS, 20 produced the largest zones of growth inhibition and were selected for further studies. Of these, 4 isolates inhibited the growth of some Gram-positive bacteria (*E. faecalis*, *L. casei* and *S. pneumoniae*), but also *E. coli* and *P. aeruginosa* (Table 1).

Based on API50CHL and API20E fermentation reactions and PCR with species-specific primers, the bacteriocin-producing isolates were identified as *L. plantarum* (strains ST23LD and ST341LD), *E. faecium* (strain ST311LD) and *L. mesenteroides* (strain ST33LD).

**Table 1.** Spectrum of antimicrobial activity recorded for inhibitory substance ST23LD, ST311LD, ST33LD and ST341LD

| Target strains                           | Inhibitory substances (cell-free supernatant) |         |        |         |
|--|---|---------|--------|---------|
|  | ST23LD  | ST311LD | ST33LD | ST341LD |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 20, 21      | +   | +       | +      | +       |
| <i>Escherichia coli</i> 8                | +   | +       | +      | +       |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 31          | -   | -       | -      | -       |
| <i>Lactobacillus casei</i> LHS           | +   | +       | +      | +       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 13556 | -   | -       | -      | -       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7          | +   | +       | +      | +       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 2, 5, 6     | -   | -       | -      | -       |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> 23       | -   | -       | -      | -       |

+ = activity; - = no activity

The activity of bacteriocins ST23LDA + ST23LDB, ST341LD, ST311LD and ST33LD recorded against Gram-negative bacteria (in this case *E. coli* and *P. aeruginosa*) is an unusual phenomenon that has thus far only been reported for a few bacteriocins of lactic acid bacteria, *viz.* bacteriocin HV219 produced by *L. lactis* subsp. *lactis* HV219 [5], bacteriocins JW11BZ produced by *L. fermentum* JW11BZ [8].

*L. plantarum* ST23LD produced the highest activity of its bacteriocin (25600 AU/ml) after 18h of growth in MRS broth, and only when incubated at 30°C. *L. plantarum* ST341LD also produced a



maximum level of 25 600 AU/ml bacteriocin, but after 16h under the same conditions. The highest bacteriocin activity for *E. faecium* ST311LD (6400 AU/ml) was recorded after 20h of growth in MRS broth, which then decreased to 3200 AU/ml during the following 2h. *L. mesenteroides* ST33LD produced its maximum bacteriocin activity of 6400 AU/ml after 22h in MRS broth, which remained at this level for the remaining 2h.

During the 24h of growth, the pH of the MRS broth decreased from 6.2 to 3.7 for strains ST23LD, ST33LD and ST341LD and from pH 6.2 to 4.4 for strain ST311LD. The cell densities (OD<sub>600nm</sub>) increased from 0.17 to 9.10 for strains ST23LD, ST33LD and ST341LD and to 2.70 for strain ST311LD.

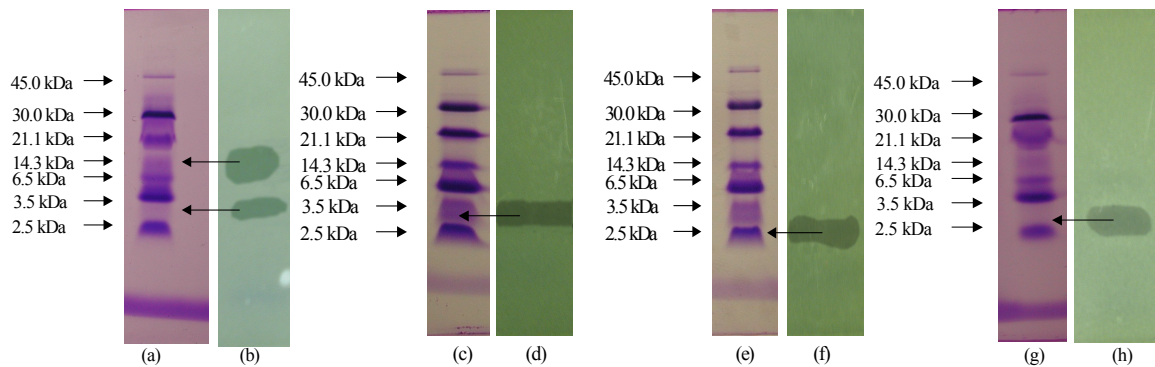


Figure 1. Zones of growth inhibition after separation of bacteriocins ST23LD (b), ST341LD (d), ST311LD (f) and ST33LD (h) by tricine-SDS-PAGE. Lanes a, c, e and g: low molecular weight marker (2.5 - 45 kDa, Amersham). *L. casei* LHS was used as sensitive strain.

All four strains produced bacteriocins at 37°C, but at lower levels (6400 AU/ml for strain ST23LD, and ST341LD, and 3200 AU/ml for strains ST311LD and ST33LD). These correspond to activity levels of between 50% and 75% for cells grown at 30°C (not shown).

Separation by tricine-SDS-PAGE indicated that *L. plantarum* ST23LD produced two bacteriocins, which were named ST23LDA and ST23LDB, with molecular sizes of approximately 3.0 and 14.0 kDa, respectively (Fig. 1b). *L. plantarum* ST341LD produced only one bacteriocin (bacteriocin ST341LD) of approximately 3.0 kDa (Fig. 1d). *E. faecium* ST311LD and *L. mesenteroides* ST33LD produced bacteriocins of approximately 2.3 kDa (Fig. 1f) and 2.7 kDa (Fig. 1h). The molecular size of bacteriocins ST23LD, ST311LD, ST33LD and ST34LD are within the range of most bacteriocins reported for the genera *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Leuconostoc* [10].

Complete inactivation of antimicrobial activity was observed after treatment of the cell-free supernatants of the four bacteriocin-producing strains with Proteinase K, papain, pronase, chymotrypsin, trypsin, pepsin and protease. No change in activity was recorded when the samples were treated with catalase and  $\alpha$ -amylase. Antimicrobial activity remained stable after incubation for 2h at pH values between 2.0 and 12.0. No decrease in activity was recorded after treatment of cell-free supernatant (pH 6.0) at 100°C for 120 min and at 121°C for 20 min. Like most bacteriocins [1,5,8], the bacteriocins described here are extremely heat tolerant.

All bacteriocins were sensitive to treatment with 1% (v/v, final concentration) Triton X-100 and Triton X-114. However, SDS, Tween 20, Tween 80 and urea at 1% (w/v) or EDTA at 0.1mM, 2.0mM or 5.0mM had no effect on the activity of any of the bacteriocins. Similar results were reported for bacteriocin J46, produced by *L. lactis* subsp. *cremoris* [11]. Plantaricin C19, did not lose its activity after treatment with SDS, Triton X-100 [12].

The addition of bacteriocins ST23LDA + ST23LDB (25600 AU/ml), ST341LD (25600 AU/ml) or ST311LD (6400 AU/ml) to early logarithmic-phase cells of *L. casei* LHS (3h-old; OD<sub>600nm</sub>=0.3) resulted in slow growth (Figs. 2a, b, c). Active growing cells of *L. casei* LHS

treated with bacteriocin ST33LD (6400 AU/ml) became resistant after 1h (Fig. 2d). Addition of the same concentration of bacteriocins ST23LdA + ST23LDb, ST341LD, ST311LD, or ST33LD to stationary-phase cells of *L. casei* LHS resulted in no inhibition (data not shown).

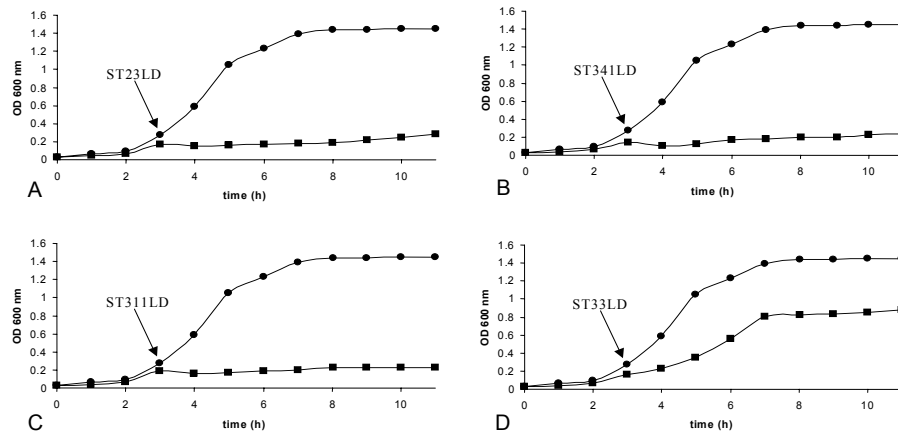


Figure 2. The effect of bacteriocins on log-phase cells of *L. casei* LHS, grown in MRS Broth. Graph A: bacteriocin ST23LD, graph B: bacteriocin ST341LD, graph C: bacteriocin ST311LD, and graph D: bacteriocin ST33LD. The arrow indicates the point in time that the bacteriocin was added. Cell growth without (●) and with added bacteriocin (■).

The fact that no bacteriocin activity could be detected after treating the producer cells with NaCl at pH 2.0, suggests that the bacteriocins do not adhere to the cell surfaces. Similar results have been reported for plantaricin ST31 [13], bacteriocins produced by *L. plantarum* JW3BZ and JW6BZ and *L. fermentum* JW11BZ and JW15BZ [8].

## References

- [1] - T. Klaenhammer - *Biochimie*. **70** (1988) 337-349
- [2] - R. Jiménez-Díaz, R.M. Rios-Sánchez, M. Desmazeaud, J.L. Ruiz-Barba, J.-C. Piard - *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993) 1416-1424
- [3] - C.M.A.P. Frantz, U. Schillinger, W.H. Holzapfel - *Int. J. Food Microbiol.* **29** (1996) 255-270
- [4] - M.V. Lean, M. Baras, J.L. Ruiz-Barba, B. Floriano, R. Jiménez-Díaz - *Int. J. Food Microbiol.* **43** (1998) 129-134
- [5] - S.D. Todorov, S.T. Danova, C.A. van Reenen, M. Meincken, G. Dinkova, I.V. Ivanova, L.M.T. Dicks - *J. Basic Microbiol.* **46** (2006) 226-238
- [6] - M.E. Stiles, W.H. Holzapfel - *Int. J. Food Microbiol.* **36** (1997) 1-29.
- [7] - H. Schägger, G. Van Jagow - *Anal. Biochem.* **166**, (1987) 368-379
- [8] - J.W. von Mollendorff, S.D. Todorov, L.M.T. Dicks - *Curr. Microbiol.* **53** (2006) 209-216.
- [9] - R. Yang, M. Johnson, B. Ray - *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 3355-3359
- [10] - L. de Vuyst, E.J. Vandamme - *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications*. London: Blackie Academic and Professional. (1994)
- [11] - E. Huot, J. Maghrous, C. Barena-Gonzalez - *Anaerobe* **2** (1996) 137-145
- [12] - A. Atrih, N. Rekhif, A.J.G. Moir, A. Lebrihi, G. Lefebvre - *Int. J. Food Microbiol.* **68** (2001) 93-109
- [13] - S. Todorov, B. Onno, O. Sorokin, J.M. Chobert, I. Ivanova, X. Dousset - *Int. J. Food Microbiol.* **48** (1999) 167-177

## **OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO PARA NECESSIDADES ESPECÍFICAS – PROJECTO PANXTODOS**

*Brites, C.<sup>1</sup>; Trigo, M.J.<sup>1</sup>; León, A.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> INIAP, Estação Agronómica Nacional, DTPA, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras.

<sup>2</sup> Agencia Córdoba Ciencia, Unidad Ceproc, Álvarez de Arenales 230, Barrio Juniors, Córdoba,  
Argentina.

Email: [carlambrites@mail.telepac.pt](mailto:carlambrites@mail.telepac.pt)

A obtenção de produtos de panificação para necessidades específicas é o tema de um projecto de cooperação do programa Ibero Americano de Ciência e Tecnologia para o desenvolvimento –CYTED, coordenado pela Agência Córdoba Ciência, Argentina e que reúne 11 Países e 18 unidades de investigação em torno do objectivo comum de produção de alimentos isentos de glúten, enriquecidos e funcionais.

O projecto desenvolve-se de 2006 a 2009 e o objectivo específico do laboratório da Estação Agronómica Nacional no ano de 2006 foi o melhoramento da qualidade do pão de milho (broa) isenta de glúten. O estudo incidiu na caracterização reológica de farinhas de milho e na avaliação dos principais factores que influenciam a qualidade da broa, nomeadamente, o tipo de moenda, a temperatura da água de amassadura, o tipo de fermentação (com e sem bactérias lácticas) e a conservação em atmosfera modificada, de modo a otimizar a qualidade da broa isenta de glúten.

As actividades previstas para 2007 incidirão na realização de acções de cooperação para: i) edição de 3 livros: Panificação com todo o tipo de farinhas, Aspectos nutricionais e saudáveis dos produtos de panificação e Utilização do frio na obtenção de produtos de panificação; ii) aferição de metodologias para a realização de análises químicas e reológicas; iii) desenvolvimento de novos produtos a partir de farinhas de milho e arroz.



# OPTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE GELIFICADOS DE MEL ENRIQUECIDOS EM FIBRA

Osório, N.; Raymundo\*, A.

Centro de Investigação em Eng<sup>a</sup> Alimentar e Biotecnologia – Instituto Piaget, ISEIT de Almada.

Quinta da Arreinel de Cima, 2800-305 Almada

Tel: +351-212946250; Fax: +351- 210120352; e-mail: [nosorio@almada.ipiaget.org](mailto:nosorio@almada.ipiaget.org),  
[araymundo@almada.ipiaget.org](mailto:araymundo@almada.ipiaget.org)

**Palavras-chave:** mel, fibra, gel, RSM, análise sensorial

**Resumo:** Como produto natural, o mel apresenta características nutritivas e propriedades únicas que fazem dele um alimento privilegiado. Desde civilizações antigas que o mel foi reconhecido pela suas faculdades terapêuticas. Facilmente digerível pelo organismo e bem tolerado, este açúcar natural torna-se uma fonte de energia aproveitada das mais diversas formas.

Neste trabalho propõe-se uma aplicação alternativa à do mel tradicional, desenvolvendo gelificados de mel utilizando um sistema gelificante constituído por goma xantana e uma fibra (*Psyllium*), que apresenta potencial efeito bifidogénico.

Para a optimização da formulação dos gelificados de mel recorreu-se à metodologia das superfícies de resposta (RSM). Avaliou-se o efeito da concentração de mel e do sistema gelificante (goma xantana e *Psyllium*, 1:1) nos parâmetros objectivos de textura (firmeza, adesividade e coesividade) e em parâmetros avaliados sensorialmente nomeadamente cor, sabor, textura e apreciação global do produto final. As medições dos parâmetros de textura foram realizadas num texturómetro TA-XT2i. Para a avaliação das características sensoriais das várias formulações recorreu-se a um painel piloto de consumidor constituído por 30 provadores não treinados.

Com a realização deste trabalho foi possível desenvolver um produto agradável (comprovado pelos resultados animadores da análise sensorial) com excelentes propriedades nutricionais e dietéticas, aliando as vantagens do consumo de mel com a ingestão de fibras.

Do estudo do efeito da concentração do mel e do sistema gelificante (goma xantana e *Psyllium*) obtiveram-se modelos com elevada aplicabilidade para os parâmetros firmeza, adesividade, análise sensorial da textura e apreciação global.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos produtos é, desde há muito tempo, uma preocupação essencial da indústria. Hoje, este desenvolvimento está a ser feito aceleradamente e os riscos têm de ser minimizados.

No período de transição da era industrial para a era pós-industrial, verifica-se que, se um produto é mais do que o resultado de um processo produtivo, ele é, sobretudo, um meio de satisfazer uma necessidade. Deste modo, o encaminhamento do produto faz-se da empresa para o consumidor, mas nasce da necessidade do consumidor [1].

Num contexto económico cada vez mais concorrencial, a inovação-produto, isto é, a pesquisa, o desenvolvimento e o lançamento de novos produtos, é para as empresas um meio essencial de conservação e conquista de faixas de mercado [2].

A introdução de novos ingredientes como: fibras, amidos modificados, ómega-3, esteréis de sacarose, adoçantes, proteínas texturizadas, antioxidantes, etc., são uma oportunidade para o desenvolvimento de novos produtos com diferentes características nutricionais e dietéticas.

Nas sociedades industrializadas o consumo de fibras tem vindo a decrescer ao longo deste século, quer pela menor ingestão de cereais e derivados, frutos, tubérculos e outros produtos hortícolas quer pela utilização das suas variedades mais refinadas. Assim sendo, o aporte em fibra é muito baixo originando as designadas “doenças da civilização”: obstipação, diverticulose, hemorróidas e até mesmo cancro do cólon [3,4].

É atenta ao tipo de vida da sociedade moderna, que a indústria alimentar, se baseia para procurar resposta às tendências de consumo, desenvolvendo novos produtos que vão ao encontro das necessidades dos consumidores, ou simplesmente pelo modernismo de determinados padrões alimentares.

Foi com base na reflexão dos actuais hábitos alimentares e estilos de vida, que a incorporação de uma fibra solúvel, o *Psyllium*, e o uso alternativo do mel, fizeram parte do projecto em estudo de um gelificado de mel enriquecido.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Para a elaboração dos gelificados de mel utilizaram-se soluções de mel, fibra de casca de *Psyllium* e goma xantana, nas proporções descritas pelo delineamento experimental.

O mel utilizado foi um mel de Rosmaninho da zona de Belmonte.

Para o enriquecimento do gelificado em fibra optou-se por uma fibra de casca de *Psyllium* em pó 100% natural da Solgar. O *Psyllium* possui na sua constituição L-arabinose, D – Xilose e ácido galacturónico, mas os seus principais constituintes são as fibras, mucilagens e óleos, sendo na casca da semente, onde se encontra a maior quantidade de fibras. Sendo o *Psyllium* rico em fibra solúvel possui uma enorme capacidade de retenção de água, característica esta designada por capacidade hidrófila, onde para cada grama de *Psyllium* há uma retenção de cerca de 10 g de água. Devido, a esta capacidade, o *Psyllium* forma um gel viscoso, capaz de se ligar a moléculas tais como, proteínas e hidratos de carbono simples. Esta fibra é utilizada como suplemento alimentar, sendo o aporte máximo diário de 5,8 g [5].

A goma xantana é um polissacárido aniónico obtido por fermentação bacteriana (*Xanthomonas campestris*). Pelo facto de possuir propriedades reológicas únicas, a xantana vem sendo amplamente utilizada como agente suspensivo, espessante, emulsionante e estabilizante.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Elaboração do gelificado de mel**

Para a elaboração das várias formulações de gelificados procedeu-se da seguinte forma: i) dissolveu-se a goma xantana em água mantendo-se em homogeneização, por agitação magnética, durante 1 hora; ii) adicionou-se o *Psyllium* e o mel; iii) aqueceu-se a mistura até atingir 60°C e manteve-se a esta temperatura durante 15 minutos; iv) armazenou-se o gelificado em frascos de vidro com 90 mL de capacidade.

Todas as formulações foram feitas em triplicado e conservadas à temperatura de refrigeração até à realização dos testes reológicos e de análise sensorial.

#### **2.2.2. Optimização da formulação do gelificado de mel**

Para a optimização da formulação do gelificado de mel, utilizou-se a metodologia das superfícies de resposta (RSM) em função de duas variáveis a concentração de mel e a concentração sistema gelificante (xantana e *Psyllium*, na proporção 1:1) utilizando o delineamento experimental designado por “Central Composite Rotatable Design” (CCRD) [6,7,8]. Assim, com este método, tentou-se encontrar modelos que relacionassem as variáveis em estudo de modo a obter as melhores respostas.

O processo de construção da matriz experimental começou com a determinação de um ponto central escolhido pela análise dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, a partir do qual se definiram os máximos, os mínimos e o intervalo de variação de cada parâmetro. Os níveis testados para cada variável encontram-se no Quadro 1.

**Quadro 1-** Níveis codificados e descodificados da matriz CCRD em função da concentração de mel e da concentração do sistema gelificante (xantana e *Psyllium* na proporção 1:1).

| Níveis Codificados | Variáveis Níveis Codificados |                             |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                    | Mel (% m/m)                  | Sistema Gelificante (% m/m) |
| -1                 | 40,00                        | 0,75                        |
| +1                 | 60,00                        | 1,75                        |
| - $\alpha$         | 35,86                        | 0,54                        |
| + $\alpha$         | 64,14                        | 1,96                        |
| 0                  | 50,00                        | 1,25                        |

### 2.2.3. Análise Instrumental da Textura

A determinação instrumental da textura foi realizada num Texturómetro TA.XT2 Texture Analyser da “Stable Microsystems, Ltd.”.

Foram realizados testes de análise de perfil de textura (TPA), designados também por testes de duas dentadas (“two bite test”), em modo de penetração. Para tal, usou-se uma sonda cilíndrica acrílica de 38 mm de diâmetro, deslocando-se à velocidade de 2 mm/s, que realizou duas penetrações de 10 mm de profundidade, com um intervalo de 5 segundos entre as dentadas. Os parâmetros objectivos de textura obtidos foram a firmeza, a adesividade e a coesividade.

### 2.2.4. Avaliação das características sensoriais do gelificado de mel

O método utilizado foi uma prova de pontuação com o auxílio de uma escala de intensidade onde os extremos foram definidos como “Não gosto” e “Gosto muito”. As características avaliadas foram a cor, o sabor, a textura e a apreciação global do gelificado. O painel foi constituído por trinta indivíduos não treinados e escolhidos de uma forma aleatória.

### 2.2.5 Análise Estatística

Os resultados da matriz CCRD em função da concentração de mel e do sistema gelificante foram avaliados pelo programa “Statistica<sup>TM</sup>”, versão 5, da Statsoft, USA, que permitiu ajustar uma superfície  $p+1$  dimensional, em que  $p$  é o número de variáveis, aos pontos experimentais.

Os efeitos lineares e quadráticos, tal como as interacções lineares de cada um dos factores estudados foram calculados.

Avaliou-se o ajustamento do modelo às variáveis em estudo determinando-se os coeficientes  $R^2$  e  $R^2_{ajust}$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos resultados da matriz CCRD em função da concentração de mel e do sistema gelificante, obtêm-se as equações das superfícies de resposta da Firmeza, Adesividade, e Análise Sensorial da Textura e Apreciação Global e os respectivos coeficientes de determinação  $R^2$  e  $R^2_{ajust}$ , que se resumem no Quadro 2. Verifica-se a existência de um efeito significativo e positivo da concentração de mel (termo linear), da concentração do sistema gelificante (termo linear) e da interacção mel/sistema gelificante na firmeza do gelificado. Quando se aumenta a concentração destas variáveis, aumenta também a firmeza do gelificado. Este facto, é justificado pela própria constituição do sistema gelificante. O *Psyllium* que por ser uma fibra solúvel absorve a água do meio contribuindo assim para a estrutura do gelificado, assim como a goma xantana e o mel.

A concentração do sistema gelificante teve um efeito significativo na adesividade, negativo no termo linear e positivo no termo quadrático.

Relativamente à análise sensorial da textura do gelificado, assim como na apreciação global, só a concentração de mel (termo linear) teve um efeito significativo e positivo. Este efeito demonstra que com o aumento da concentração de mel, a aceitação da textura e em termos de apreciação global aumentará por parte dos provadores.

Os elevados valores dos coeficientes  $R^2$  e  $R^2_{ajust}$ , associados às equações de coorelação apresentadas, demonstram a elevada aplicabilidade dos modelos ajustados aos pontos experimentais relativamente à firmeza, à adesividade, à apreciação sensorial da textura e à apreciação global do gelificado.

**Quadro 2-** Equações das superfícies de resposta da Firmeza, Adesividade, e Análise Sensorial da Textura e Apreciação Global.

| Respostas                 | Equações do Modelo (*)   | $R^2$ | $R^2_{ajust}$ |
|---------------------------|--|-------|---------------|
| Firmeza                   | $F = 0,240 - 0,277 \times [\text{goma}] - 0,005 [\text{mel}] + 0,008 \times [\text{goma}] \times [\text{mel}]$ | 0,98  | 0,97          |
| Adesividade               | $A = 1,278 - 1,636 \times [\text{goma}] + 0,508 \times [\text{goma}]^2$  | 0,94  | 0,91          |
| Análise Sensorial Textura | $AS_T = 0,189 + 0,095 \times [\text{mel}]$   | 0,71  | 0,67          |
| Apreciação Global         | $AG = 0,298 + 0,096 \times [\text{mel}]$   | 0,83  | 0,81          |

(\*) Apenas se consideraram os efeitos significativos

Não foi possível estabelecer relações matemáticas para a avaliação da coesividade, da apreciação sensorial da cor e do sabor uma vez que nenhuns dos factores considerados tiveram efeito significativo nestes parâmetros.

#### 4. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível desenvolver um produto agradável (comprovado pelos resultados animadores da análise sensorial) com excelentes propriedades nutricionais e dietéticas, aliando as vantagens do consumo de mel com a ingestão de fibras.

Do estudo do efeito da concentração do mel e do sistema gelificante (goma xantana e *Psyllium*) obtiveram-se modelos com elevada aplicabilidade para os parâmetros firmeza, adesividade, análise sensorial da textura e apreciação global do gelificado de mel.

#### Referências

- [1] Pires, A. R. *Inovação de Novos Modelos, Técnicas e Métodos de Apoio à Conceção*, Edições Sílabo, Lda, Lisboa (1999).
- [2] Lindon, D., Lendrevie J., Rodrigues V. J., Dionísio P., *Mercator. Teoria e Prática do Marketing*, Publicações Dom Quixote, Lisboa, (2000).
- [3] Almeida, M. D. & Afonso, C. P. *Princípios Básicos de Alimentação e Nutrição*, Lisboa, (1997).
- [4] Rémésy, C., *Alimentação e Saúde*, Básica de Ciência e Saúde, Divisão Editorial Instituto Piaget. Lisboa (1994)
- [5] Solgar, *Folheto informativo do Psyllium em pó 100% Natural* (2004).
- [6] Giovanni, M., *Response Surface Methodology and Product Optimization*, Food Technology, (1983).
- [7] Montgomery, D. C., *Response Surface Methods and Designs. In: Design and Analysis of Experiments*, Nova York, John Wiley and Sons eds, (1991).
- [8] Vuataz, L., *Response surface methods, In: Statistical procedures in food Research*. Elsevier Applied Science, Edited by J. R. Piggot (1986).



# POTENTIAL ANTIOXIDANT CAPACITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cynara cardunculus* L. USED AS COAGULANT IN PDO CHEESES

Duthoit<sup>1a</sup>, M.; Alegrial<sup>1b</sup>, C.; Feio<sup>2</sup>, S. and Roseiro<sup>3\*</sup>, L.B.

INETI – Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Estrada do Paço do Lumiar, 22 Lisboa, Portugal - <sup>1</sup>DTIA - <sup>a</sup>UIL and <sup>b</sup>UTPV; <sup>2</sup>Dept. de Química and <sup>3\*</sup>Dept. de Biotecnologia  
Tel. +351 210924600 ext. 4279 Fax +351 217163636 email: luísa.roseiro@ineti.pt

**Keywords:** *Cynara cardunculus*, L., cardoon, antioxidant capacity, antimicrobial activity

**Summary:** Aqueous extracts of *Cynara cardunculus* L. (cardoon) flowers have been used for centuries as vegetable coagulants for traditional and Protected Designation of Origin (PDO) cheesemaking in the Iberian Peninsula. Recent works revealed the presence of phenolic compounds in the aqueous extracts from cardoon flowers, which were also detected in the cheese curd made using this coagulant. These phenolic compounds have been reported as having beneficial antioxidant health effects and anti-inflammatory activity. The aim of the present work consisted in investigating the potential antioxidant activity of the aqueous extract of the cardoon flowers used by cheesemakers as vegetable coagulant. Additionally, it was also investigated the potential antimicrobial activity of this extract against selected microorganisms (bacteria, yeasts and filamentous fungi). Samples of aqueous extracts from cardoon flowers prepared according to two procedures (traditional and semi-industrial) were analysed for their antioxidant activity using an improved TEAC assay. For the antimicrobial activity, the prepared extracts were freeze-dried and then redissolved in water, and the antimicrobial assay was performed on paper discs. Results obtained for antioxidant activity ranged from 12-15  $\mu\text{mol TEAC/L}$  aqueous extract. The extracts also showed to be more effective on inhibiting yeasts and filamentous fungi than bacteria.

## 1. INTRODUCTION

The importance of aromatic plants as natural antioxidants is well established. Their main constituents, polyphenolic substances, are a class of higher plant secondary metabolites, and tend to be water-soluble because they frequently occur combined as glycosides. Polyphenols are antioxidants with redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers. Their significance for human diet and antimicrobial activity have been established and also their anti-inflammatory, antidiarrheal, antiulcer, antiviral, antiallergic and vasodilatory actions have been reported. These compounds have been proposed as potential natural preservatives in foodstuffs. The occurrence of phenolic compounds in milk and dairy products maybe a consequence of several factors, such as the consumption of particular fodder crops by dairy animals or their deliberate addition as specific flavouring or functional ingredient. However, for the manufacture of some traditional and PDO Iberian cheeses, (eg. Serra da Estrela, Serpa and La Serena cheeses) the use of an aqueous extract of flowers from cardoon as coagulant is compulsory. Recent works revealed the presence of phenolic compounds in the aqueous extracts from cardoon flowers, namely isorhoifolin, apigenin-7-*O*-glucuronide, apigenin and luteolin, which were also detected in the cheese curd made using this coagulant (Roseiro et al., 2005). The aim of the present work consisted in investigating the potential antioxidant activity of the aqueous extract of the cardoon flowers used by cheesemakers as vegetable coagulant, applying an improved method

for the generation of ABTS radical. Additionally, it was also investigated the potential antimicrobial activity of this extract against selected microorganisms (bacteria, yeasts and filamentous fungi). Both antioxidant activity and antimicrobial activity will indicate that the phenolic compounds present could contribute, not only additional health benefits to cheese consumers, but also to function as a natural preservative in cheese, considering that these are made from raw ewe's milk.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Standards and chemicals

All reagents used were analytical grade purchased from various suppliers. Water used for standards and solutions preparation was obtained from a Millipore Milli-Q water purification system. Trolox standard solutions were prepared in ethanol. Culture media were Malt Extract Agar for fungi and Brain Heart Infusion M for bacteria, both from Merck.

### 2.2 Microorganisms

The microorganisms used were obtained from the Culture Collection of Industrial Microorganisms of the Laboratório de Microbiologia Industrial-INETI-DB. **Gram-positive bacteria:** *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*. **Gram-negative bacteria:** *Escherichia coli* CCMI 270, *Pseudomonas aeruginosa* CCMI 331. **Filamentous fungi:** *Aspergillus niger* CCMI 296, *Cladosporium* sp CCMI 621, *Trichoderma harzianum* CCMI 783. **Yeasts:** *Candida albicans* CCMI 209, *Debaryomyces hansenii* CCMI 66, *D. kloekeri* CCMI 157, *D. nicotinae* CCMI 75, *D. subglobosus* CCMI 78, *Rhodotorula minuta* CCMI 165, *R. palida* CCMI 170, *R. rubra* CCMI 43, *R. rubra* CCMI 166, *R. rubra* CCMI 185.

### 2.3 Plant material

Aqueous extracts of dried flowers from *Cynara cardunculus* L. were obtained from two cheesemakers in Alentejo (C1 and C2). The aqueous extracts were prepared by the cheesemakers according with their traditional procedure to be used as coagulant. In short this consists in soaking the dried flowers in cold water and macerating with a mortar and pestle or with a grinder. Other two extracts were prepared in the lab (C3 and C4), according to the traditional methodology, from dried flower samples obtained previously at local cheesemakers. These four extracts were then filtered through a cloth and frozen or freeze-dried prior to use.

#### Antioxidant capacity

The antioxidant capacity was determined in the four *Cynara cardunculus* aqueous extracts samples according to the method described by Re et al (1999). The ABTS radical was produced the day before by reacting ABTS with potassium persulfate overnight. ABTS radical thus formed was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ( $\pm$  0.02) at 734 nm, 30°C. Trolox, a water-soluble analogue of vitamin E, was used as the antioxidant standard. The experiments were done in a UNICAM mod. UV4-50 UV/Vis spectrometer, at 734 nm. Diluted ABTS radical was added to Trolox standard solutions (0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0  $\mu$ M) and absorbance readings were taken 1min after mixing up to 7 min, and the percentage inhibition of the ABTS radical absorbance was determined. The extent of

inhibition of the absorbance of the ABTS radical plotted as a function of Trolox concentration makes possible to determine the TEAC (Trolox, Equivalent Antioxidant Activity) for the samples analysed. Three replicates of each standard and sample were used for the results.

## 2.5 Antimicrobial activity

The procedure was performed according to Gadd (1989). A  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> microorganisms solution was incorporated in the suitable culture medium in Petri dishes. Filter paper discs (Oxoid) were impregnated with 0.02 mL of the extract (0.5 mg of freeze-dried sample/disc) and set on the agar Petri dishes. After 24-48 h incubation, the plates were observed for antimicrobial activity, indicated by the formation of a clear zone around the discs. For bacteria the cells counting was performed in a UNICAM Spectrophotometer at 620nm. For fungi, the Neubauer chamber was used for spore counting. The diameter of the zone of inhibition was measured in millimeters.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Antioxidant activity

Fig.1 shows the calibration curve obtained by plotting the Trolox concentration range against the % of inhibition of ABTS radical after 7 min. reaction. The antioxidant capacities of samples measured against the Trolox standard and expressed as TEAC are shown in Table 1. Results are presented as TEAC per liter of aqueous extract normally used as coagulant and as TEAC per gram of dried flower of *C. cardunculus*.

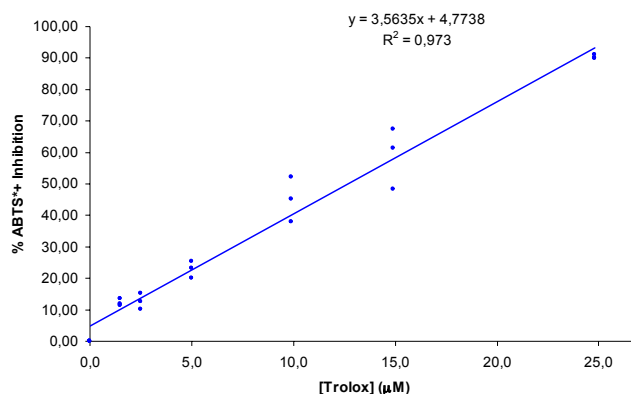


Fig. 1 – linear correlation of Trolox concentration versus % ABTS radical inhibition

Table 1 – Antioxidant capacity of *C. cardunculus* L. expressed as TEAC

| <i>C. cardunculus</i> samples | % Inhibition ABTS radical | µM TEAC /L aqueous extract | µM TEAC /g dry flowers |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| C1                            | 56.2                      | 14.4                       | 0.24                   |
| C2                            | 46.9                      | 11.8                       | 0.2                    |
| C3                            | 55.2                      | 14.2                       | 0.24                   |
| C4                            | 58.6                      | 15.1                       | 0.25                   |

Considering that ca. 1 liter of aqueous extract of flowers from *C. cardunculus* is added to 100 L of milk in traditional/DOP ewe's milk cheesemaking, an average value of ca. 14 µM TEAC

/L of antioxidant capacity content will be transferred into cheese. In a previous work (Marques, C. *et al.*, 2005), the concentration of total phenolic compounds in the aqueous extract of the flowers from *C. cardunculus* was determined by the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as standard. According to the value obtained for the total phenolic content (ca. 7 mg GAE/g dried flower) it would be expected a relatively higher value for the antioxidant activity of this extract, as usually there is a direct linear correlation between these two values. Thus, the average value of 0.23  $\mu$ M TEAC /g for dried *C. cardunculus* flowers is probably due to the fact that the main flavonoid constituents of the flowers are flavonoid glycosides, which usually have low TEAC values.

### 3.2 Antimicrobial activity

The extracts were active against *Cladosporium* sp, *Trichoderma harzianum*, *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula palida*, according to the results shown in Table 2. The aqueous extract of *Cynara cardunculus* used as coagulant shows particularly good activity against *Rhodotorula rubra*, a yeast responsible by the presence of an orange pigment in raw milk cheese rind. No activity was observed against the other microorganisms tested.

Table 2. Antimicrobial activity of aqueous extract of *Cynara cardunculus* L.

| <i>Cladosporium</i> sp | <i>T. harzianum</i> | <i>R. rubra</i> 185 | <i>R. palida</i> |
|------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 15 mm                  | 16 mm               | 40 mm               | 16 mm            |

The results obtained revealed that the aqueous extract of *Cynara cardunculus* L showed to be more effective on inhibiting filamentous fungi and yeasts and failed to inhibit the bacteria tested, but other bacteria should be considered, specially bacteria normally present in raw milk cheese.

Both results for antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous extracts of the flowers from *Cynara cardunculus* L were done for the first time and revealed to be promising. However, further trials are in course to draw a complete characterization of this extract.

#### Literature Cited:

- Gadd, M., G.; Toxicity Testing Using Microorganisms, 1989, Vol. II, pg. 52, Bernard J. Dutka and Gabriel Bitton CRC Press Boca Raton, Florida.
- Marques, C., *et al.*, (2005). Implementação e validação do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor em compostos fenólicos totais – aplicação a extractos de flor de cardo e queijo. Livro de resumos do 7º Encontro de química dos Alimentos, 13-16 de Abril de 2005, ESAV – Viseu.
- Re, R. *et al.*, (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & medicine, vol. 26, n°s 9/10, pp.1231-1237.
- Roseiro, L.B., *et al.*, (2005). Preliminary observations of flavonoid glycosides from the vegetable coagulant *Cynara* L. In protected designation of origin cheeses. International Dairy Journal 15, 579-584.

# PREPARATION OF FRANKFURT FISH SAUSAGES WITH PROTEINS RECOVERED FROM CAPE HAKE BY-PRODUCTS

*Pires, C.<sup>1\*</sup>; Godinho, V.<sup>1</sup>; Batista, I.<sup>1</sup>; Ribeiro, A.T.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> INRB/IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa. Tel.: 21 302 70 00, Fax: 21 301 59 48, \*e-mail: [cpires@ipimar.pt](mailto:cpires@ipimar.pt)

<sup>2</sup> Escola Superior Agrária de Santarém, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001 - 904 Santarém, Tel.: 243 307 300, Fax: 243 307 301

**Key words:** by-products, Cape hake, proteins, fish sausages

## **Abstract:**

The considerable nutritional value and health benefits of fish proteins are generally recognized. These properties make fish protein isolates an excellent raw material for the preparation of different food products.

Fish processing such as portioning generates a substantial amount of by-products, which have protein content similar to that of fish muscle of the starting material. However, these by-products present bones, pieces of skin and other foreign materials, which prevent their direct utilisation in food products. In order to upgrade this raw material from Cape hake portioning the proteins were recovered by alkaline solubilisation followed by isoelectric precipitation.

The functional properties of these proteins make them useful ingredients for different food products and in this work it is described their utilization to prepare Frankfurt fish sausages. In this approach mixtures of hake mince and recovered proteins in different proportions replaced pork meat.

The products where the meat pork was completely replaced by the recovered proteins (RP) or by a mixture of 75 % RP and 25 % hake mince showed unsatisfactory sensory characteristics (soft texture and unpleasant flavour). Thus a mixture of hake mince (50 %) and RP (50 %) was chosen to prepare the sausages. In parallel sausages with 100% hake mince were prepared as the control.

The rheological properties (maximum load and displacement, hardness, elasticity and cohesiveness) of both fish sausages were quite similar as well as the colour parameters (L\*, a\* and b\*). Fish sausages prepared with 1:1 mixture presented a fishy taste slightly stronger and were more elastic than those prepared with 100 % hake mince. However, these sausages were much softer and lighter than commercial sausages prepared from pork meat.

## **1. INTRODUCTION**

The protein recovery from underutilized species or by-products by alkaline solubilisation and precipitation at the isoelectric point has deserved much attention in recent years[1]. It is claimed that higher yield of protein recovery than in the traditional surimi processing is achieved. The recovered proteins also show good functional properties allowing them to use in different types of food products. Among them fish sausages are very convenient and they are also good model to check the utilisation of those fish proteins. They may also permit the incorporation of different functional ingredients to produce valuable nutraceuticals. The objective of this work was to utilize recovered proteins by alkali-aided

processing of Cape hake by-products in the preparation of sausages and check their acceptability.

## 2. MATERIAL AND METHODS

The proteins used in the preparation of Frankfurter-type sausages were recovered from Cape hake by-products following the methodology described by Batista[2] and briefly shown in the figure 1.

The proximate chemical composition was determined according to AOAC[3].

The standard recipe used in the preparation of fish sausages is shown in Table 1.

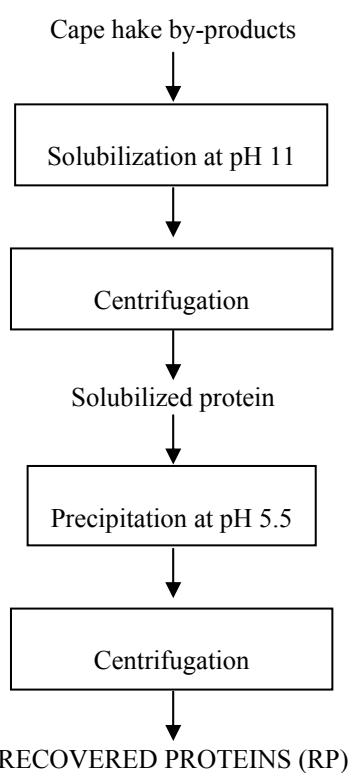


Figure 1 – Alkaline protein recovery procedure.

Table 1 – Standard recipe of Frankfurter-type sausage.

| Ingredient       | %    |
|------------------|------|
| Pork meat        | 52.0 |
| Fat pork         | 15.0 |
| Water            | 24.0 |
| Potato starch    | 3.0  |
| Salt             | 2.5  |
| Sodium caseinate | 1.2  |
| Soya protein     | 1.0  |
| Seasoning        | 0.4  |
| Glucose          | 0.4  |
| Polyphosphate    | 0.3  |
| Ascorbic acid    | 0.1  |
| Smoke            | 0.1  |

In this study the pork meat was completely replaced by a mixture of hake mince (HM) (50 %) and recovered proteins (RP) (50 %). In parallel sausages with 100% hake mince were prepared as the control. The preparation of sausages was done as reported by Cardoso[4].

The texture measurements (puncture and compression tests) were performed in an Instron model 4301 texturometer as referred by Mendes[5]. Gumminess was calculated as the product of hardness and cohesiveness.

The colour of samples was measured with five replicates, in a colour meter Macbeth Color-Eye 3000. Tristimulus colour coordinates were used to measure the degree of lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ). Chroma ( $((a^{*2}+b^{*2})^{1/2})$ ) and hue ( $\arctg(a^*/b^*)$ ) values were also calculated.

The sensory analysis of fish sausages was done by a group of panellists who evaluated the colour, flavour, taste and texture. The products were rated in a scale of 0 to 5, where 0 corresponded to poor and 5 to excellent product.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The recovered proteins presented the following chemical composition: 87.3 % moisture, 11.4 % protein, 0.4 % fat, and 0.3 % ash. The percentage of the main constituents is quite similar to that of minced hake but the muscle structure still remaining in the mince is completely absent in the recovered proteins.

Different percentages of recovered proteins and hake mince were used in the preparation of sausages and the general sensory characteristics of those products are summarized in table 2.

The total replacement of pork meat by RP or by a mixture of 75% RP and 25% HM did not allow obtaining satisfactory products. On the other hand, the products D and E deserved a very good acceptance by the panellists. However, the mixture with 50 % RP and 50 % HM was selected for the preparation of the sausages because of its acceptance and also having in mind the highest possible incorporation of RP in these products. The results of texture measurements shown in figure 2 indicate that all parameters, with the exception of maximum displacement, of commercial sausage were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of the sausages prepared with fish proteins. Similar texture values of both fish sausages were obtained but the statistical analysis indicated that sausages prepared with 100 % HM had lower ( $P < 0.05$ ) elasticity, maximum load and displacement. Close values ( $0.009 \pm 0.001$ ) for the gumminess of both fish sausages were obtained but they were considerably lower than that of commercial sausage ( $0.043 \pm 0.001$ ).

Table 2 - Products prepared with different percentages of HM and RP.

|                           | A   | B   | C   | D   | E  |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|----|
| Recovered proteins (%)    | 100 | 75  | 50  | 25  | 25 |
| Hake mince (%)            | --- | 25  | 50  | 75  | 25 |
| Pork meat (%)             | --- | --- | --- | --- | 50 |
| Global sensory evaluation | 0   | 1   | 4   | 4   | 5  |

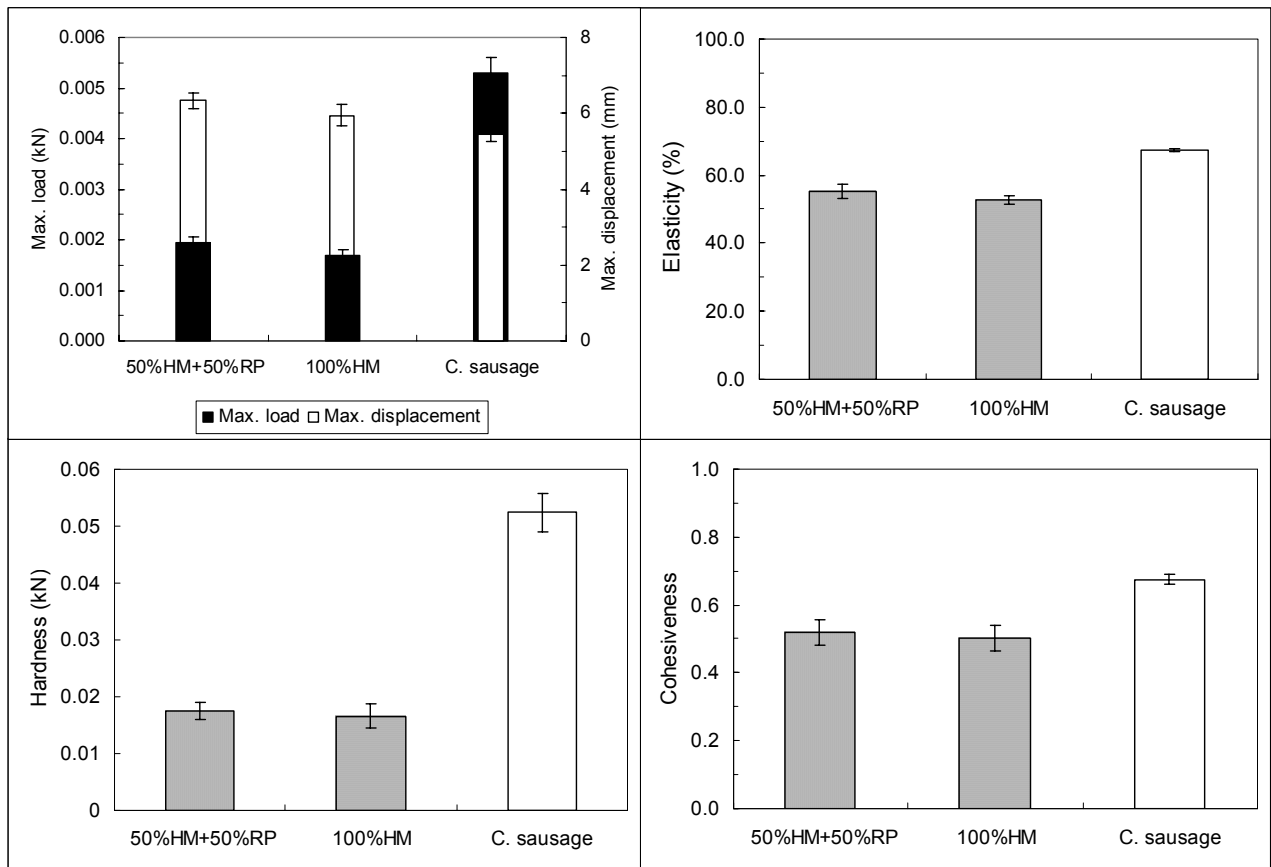


Figure 2 – Texture measurements of fish and commercial sausages. Mean values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

As it can be seen in Table 3 both fish sausages were lighter than commercial sausage but the chroma values were similar. On the other hand, the hue value of commercial sausage was rather different from the others.

Table 3 – Colour parameters of sausages.

|                    | L*     | a*     | b*    | Chroma | Hue   |
|--------------------|--------|--------|-------|--------|-------|
| 100 % HM           | 82.341 | 0.0785 | 7.177 | 7.2    | 0.011 |
| 50 % HM + 50 % RP  | 83.122 | 0.0495 | 8.065 | 8.1    | 0.006 |
| Commercial sausage | 68.555 | 2.977  | 5.228 | 6.0    | 0.518 |



In figure 3 are shown the main results of the sensory analysis of fish sausages. The taste of products prepared with 50 % RP and 50 % HM was considered slightly more fishy and unpleasant than that of products obtained with 100 % HM. On the other hand, the former products were elastic and harder than the products with only minced hake.

These results allow to concluding that proteins from Cape hake by-products recovered by alkaline solubilisation followed by isoelectric precipitation can be used in the preparation of fish sausages with good acceptability.

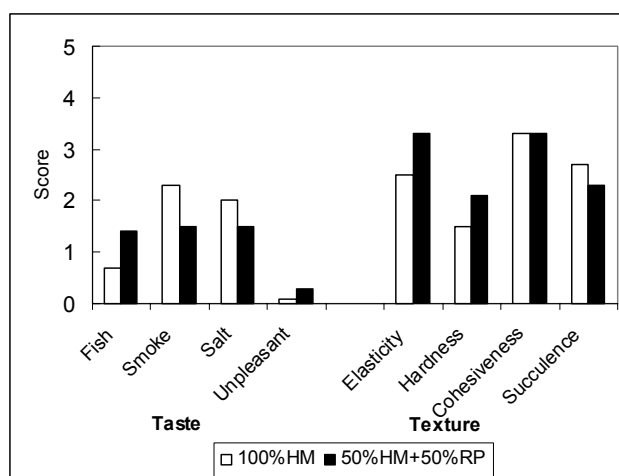


Figure 3 – Score of the sensory analysis of fish sausages.

### Acknowledgments

This work was financed by the EU project "High-added value functional seafood products for human health from seafood by-products by innovative mild processing" (PROPEPHEALTH). The authors also wish to express their gratitude to Eng. Carlos Cardoso for the measurement of the texture properties of commercial sausages.

### References

- [1] W. Park (ed.) – *Surimi and Surimi Seafood*, Marcel Dekker Inc, New York (2000)
- [2] J. B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø, J. Oehlenschläger (eds.) – *Seafood research from fish to dish. Quality, safety and processing of wild and farmed fish*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands (2006)
- [3] Association of Official Analytical Chemists (ed.) – *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Inc. Arlington, USA (1990)
- [4] C. Cardoso, R. Mendes, M. L. Nunes – *International Journal of Food Science and Technology* (Accepted for publication)
- [5] R. Mendes, I. Batista, R. Kandando, N. Howell – *Journal of Food Biochemistry* **22** (1998) 511



# PROTEÍNAS DO LACTOSORO DE BOVINO AÇORIANO. AVALIAÇÃO DA ACEITABILIDADE SENSORIAL DE NOVOS ALIMENTOS FUNCIONAIS

*Silva, G., Pimentel, R., Lima, E. \*, Baptista, J.\**

Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD)

Rua da Mãe de Deus, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

\* Tel +351-296 650 172 Fax +351-296 650 171 e-mail: [elis@notes.uac.pt](mailto:elis@notes.uac.pt) ou [baptista@notes.uac.pt](mailto:baptista@notes.uac.pt)

**Palavras-chave:** análise sensorial, alimentos funcionais, lactosoro bovino, proteínas séricas

**Resumo:** Estudo do aproveitamento das proteínas do lactosoro de bovino açoriano, visando a potencial implementação de novas bebidas lácteas na indústria açoriana, tendo por base a análise sensorial.

## 1. INTRODUÇÃO

O lactosoro, subproduto resultante da fabricação de queijo ou da extração da caseína, contém, aproximadamente, metade dos sólidos presentes no leite, incluindo cerca de 20% de proteínas (albuminas, globulinas e enzimas), lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e alguma gordura. As proteínas do lactosoro possuem elevado valor nutricional, devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais e apresentam conformações globulares compactas que lhes conferem propriedades funcionais próprias [1].

As inúmeras possibilidades, tecnologicamente viáveis, para o aproveitamento das proteínas do lactosoro, em farmácia e dietética, constituem não só uma mais valia para a indústria de lacticínios açoriana, como a resolução dos graves inconvenientes resultantes da sua rejeição para o meio ambiente.

O objectivo do nosso estudo foi o aproveitamento do soro doce de leite bovino açoriano, na forma pasteurizada (líquida), para a preparação de um sumo de fruta rico em proteínas, minerais e vitaminas que poderá ser introduzido, por exemplo, na merenda escolar. As formulações alimentares confeccionadas foram submetidas à apreciação de um painel sensorial.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de soro de leite bovino foi fornecida pela Fábrica de Lacticínios UNILEITE, U.C.R.L. (Arrifes, S. Miguel, Açores) em Outubro de 2005 e foi mantida a -8 °C até à sua posterior utilização. Os sumos comerciais (manga, maçã+morango, maçã e ananás) foram da marca Compal, o adoçante (aspartamo) em pó da Rio Bravo e o açúcar da Sinaga.

Após filtração da amostra de soro, o filtrado foi pasteurizado a 71 °C, durante 20 minutos, e, depois de arrefecido, foi guardado à temperatura de 4 °C durante uma noite.

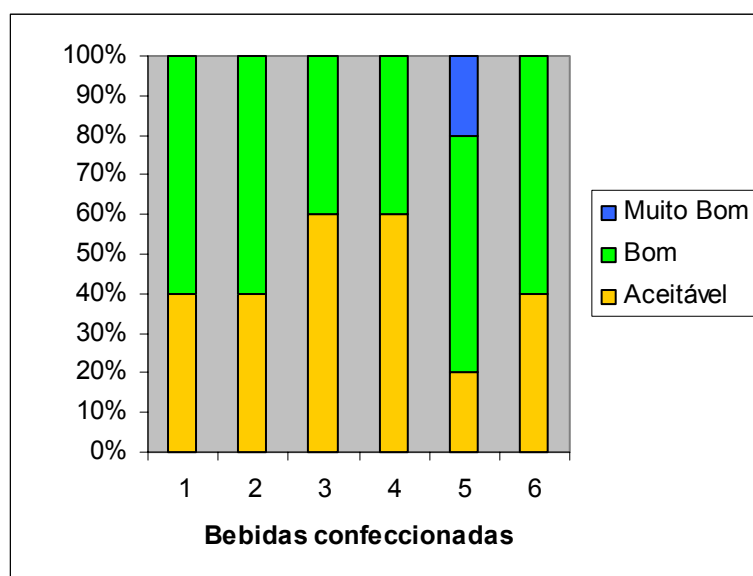
O soro e o sumo foram misturados em várias percentagens, utilizando um homogeneizador. As bebidas resultantes foram pasteurizadas a 80 °C, durante 2 a 3 segundos, e, depois de aquecidas em água a 100 °C (esterilização), durante 3 minutos, foram guardadas a 8 °C até

posterior análise sensorial, efectuada na sala de provas do DCTD por um painel de provadores constituído por elementos de diferentes grupos etários.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objectivo deste projecto foi associar lactosoro doce açoriano a um sumo comercial com a finalidade de se obter uma bebida láctea rica em minerais e vitaminas que, para além de possuir as agradáveis características sensoriais das frutas, apresentaria benefícios para a saúde promovidos, nomeadamente, pelas proteínas do soro.

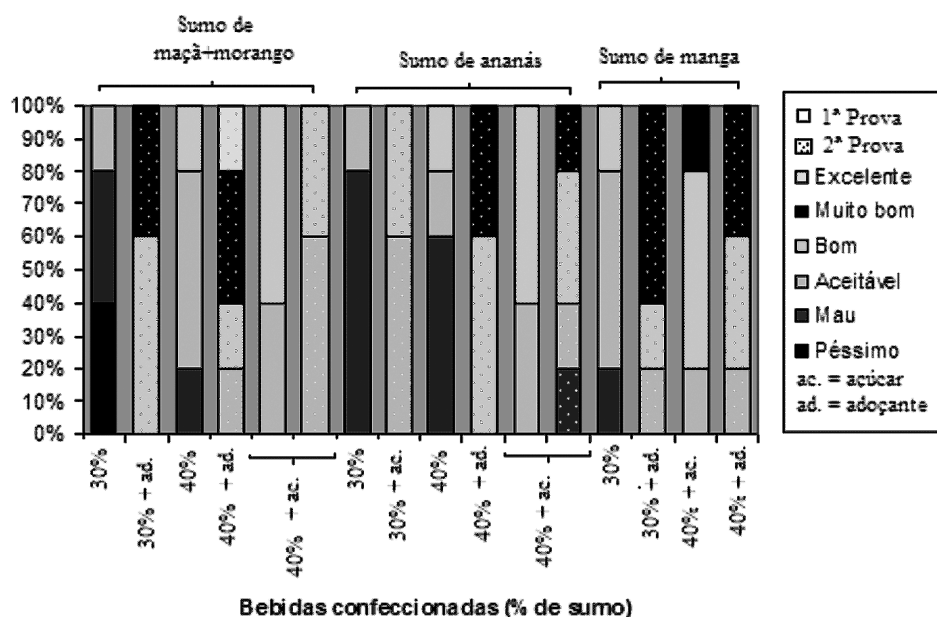
Assim, procedeu-se à formulação de bebidas com diferentes concentrações de sumo (20%, 30% e 40%) e de lactosoro, utilizando-se, para tal, os seguintes sumos de frutos: manga, maçã+morango, maçã e ananás. As bebidas confeccionadas foram analisadas, quanto ao sabor (péssimo, mau, aceitável, bom, muito bom ou excelente), por um painel de provadores, em local apropriado. Da análise dos resultados obtidos, observou-se que, de um modo geral, as bebidas com maiores concentrações de sumo de fruto foram as mais preferidas (Figura 1).



**Figura 1** – Bebidas (sumo + lactosoro) com maior aceitabilidade (em %), quanto ao sabor, segundo o painel sensorial. Legenda: **1** – sumo de maçã+morango a 40% + açúcar; **2** – sumo de ananás a 40% + açúcar; **3** – sumo de manga a 20% + açúcar; **4** – sumo de manga a 40%; **5** – sumo de manga a 40% + açúcar; **6** – sumo de maçã a 40% + açúcar

Acrescido ao parâmetro concentração de sumo verificou-se, ainda, uma maior aceitabilidade pelas bebidas às quais se adicionou açúcar e pelos sabores a maçã+morango, ananás e manga. Com base nos resultados obtidos na primeira prova, formularam-se então bebidas adocicadas contendo concentrações de 30 e 40% de sumo dos frutos preferidos, sendo o restante da bebida lactosoro. As respostas continuaram a ser bastante diversificadas, no entanto, a bebida confeccionada com sumo de ananás obteve bons resultados, o que poderá vir a ser uma mais-valia, num futuro próximo, dado que nos situamos numa região onde se pratica a cultura biológica do ananás.

Na Figura 2 apresenta-se o cruzamento dos dados obtidos nas duas provas sensoriais, para os sumos maçã+morango, ananás e manga.



**Figura 2** – Comparação da aceitabilidade (em %), relativa ao sabor, das bebidas confeccionadas à base de lactosoro e de sumo de maçã+morango, sumo de ananás e sumo de manga, nas duas provas sensoriais realizadas

Analisando o gráfico apresentado na Figura 2, verifica-se uma maior preferência pelos sumos adoçados, como já foi referido, assim como uma coerência na aceitabilidade das bebidas de composição igual, apresentadas nas duas provas.

Concluídas as duas provas de análise sensorial, relativas ao sabor, escolheu-se a bebida ideal: 40% de sumo de ananás, 60% de lactosoro e adoçante (0.5g/100mL); esta bebida apresenta o aroma mais intenso, mantendo as qualidades organolépticas por dois meses sob refrigeração. Finalmente, submeteu-se o painel sensorial à Prova Triangular, tendo todos os provadores identificado correctamente a amostra de referência.

#### 4. CONCLUSÕES

O presente projecto consistiu no desenvolvimento de uma bebida cuja matéria-prima básica é o soro doce de leite bovino açoriano, que é desperdiçado para o meio ambiente durante o processo de fabricação do queijo. As características organolépticas dos novos produtos foram avaliadas por um painel sensorial.

Tendo em conta a maior aceitabilidade pelo painel de avaliação, num futuro próximo as bebidas confeccionadas com lactosoro açoriano e sumo de ananás biológico apresentarão na sua composição, não só os benefícios das proteínas séricas (elevado teor de aminoácidos essenciais), como também os do ananás açoriano (elevado teor de enzimas proteolíticas com significativo impacto na saúde humana).

#### Referências

[1] – J.A.B. Baptista, J.F.P. Tavares, M.S.L. Jerónimo – Proteínas do lactosoro - poluição ou mais valia. Determinação da sua capacidade de gelificação, *Açoreana* 8 (1998) 545-557



### **3. INOVAÇÃO E ALIMENTOS TRADICIONAIS**

---

#### **3.1 Sessão Plenária**

**“Productos Tradicionales e Inovação”**

#### **3.2 Sessão de Comunicações Orais**

#### **3.3 Sessão de Comunicações Orais de Painéis**

#### **3.4 Painéis**





# PRODUCTOS TRADICIONALES E INNOVACIÓN

*García\*, C.; Jurado, A. y Tovar, J.*

F. V., U. Extremadura

**Palabras clave:** innovación alimentaria, productos tradicionales

**Abstract:** Los productos tradicionales son aquellos cuya elaboración y consumo se ha transmitido a lo largo de los tiempos. En ellos la innovación puede afectar al producto o a su proceso de elaboración y viene determinada generalmente por las demandas de los consumidores y las exigencias de la nueva economía de mercado. En este artículo centraremos la atención en los avances más llamativos de productos de larga tradición como los productos cárnicos o los quesos.

**Productos tradicionales** son aquellos alimentos avalados por un consumo transmitido de generación en generación lo mismo que el proceso que los ha originado. Generalmente estos productos están ligados a una localización geográfica más o menos amplia y es su propia calidad la que ha propiciado su extensión a otros territorios.

Dentro de esta definición entran todo tipo de productos desde vinos hasta platos cocinados pasando por un sinfín de productos cárnicos, lácteos, dulces, etc. En este artículo centraremos nuestra atención en los productos cárnicos curados y en los quesos por tratarse de alimentos de una larga tradición, de una gran importancia económica y susceptibles de innovación.

**Innovación** es la introducción de nuevas ideas, productos, servicios y prácticas con la intención de ser útiles para el incremento de la productividad. La innovación puede ser promovida por los proveedores (basada en nuevas posibilidades tecnológicas) o por la demanda (basada en necesidades sociales y del mercado).

La innovación puede afectar al producto o a su proceso de elaboración. La innovación de producto es una de las estrategias de empresa encaminada a ganar competitividad en el mercado bien mediante ahorros de costes de producción o distribución, bien mediante éxitos comerciales (aumento de ventas, fidelización de clientes, aumento de cuota de mercado, etc.). A pesar de que los productos tradicionales tienen un mercado asegurado por los usos y costumbres, estas cambian y el industrial que quiera mantener su cuota en el mercado se ve obligado a innovar por diversas razones:

- Para mejorar la relación con el cliente al presentarle nuevos beneficios.
- Para presentar nuevos argumentos de ventas.
- Para mejorar la imagen de su empresa presentándola como activa y moderna.
- Para establecer barreras de entrada a la competencia.
- Para conseguir nuevos mercados
- Sin embargo y precisamente debido a lo que hemos ido mencionando (producto de calidad, consumo asegurado, etc.) hay que poner especial atención en qué es lo que hay que innovar y como hay que hacerlo y para ello es necesario tener en cuenta una serie de circunstancias como son:
  - Las demandas del cliente
  - El cumplimiento de la normativa vigente
  - Una nueva estrategia de mercado
  - Un nuevo avance en la tecnología

Teniendo en cuenta estos aspectos, analizaremos las posibilidades de innovación en el caso de los productos que nos ocupan.

### ***Innovación en productos cárnicos***

Los productos cárnicos curados son alimentos preparados a base de carne, grasa y otros partes del animal convenientemente salados y/o adobados y que presentan un alto valor nutritivo (proteínas, hierro, etc.) y también un alto poder calórico. El cliente los demanda por el placer que despierta su consumo pero en la actualidad, las circunstancias de la vida moderna (prisas, estrés, etc.), los avances en las ciencias de la salud y el bombardeo de información sobre alimentos saludables, ha conducido a que los consumidores muestren una cierta prevención frente a estos alimentos. En este caso parece claro que las **demandas del cliente** irían encaminadas hacia alimentos “más sanos” y por lo tanto la innovación también debe ir en este sentido.

Son dos los aspectos en los que se centra la atención cuando se hace referencia a los inconvenientes que presentan los productos cárnicos en primer lugar el contenido en sal y en segundo lugar el contenido y la composición de la grasa.

En lo referente al contenido en sal, las nuevas tendencias se dirigen hacia una reducción del salado de los productos. Sin embargo, esta disminución debe tener muy en cuenta los aspectos sanitarios y los tecnológicos, como por ejemplo, riesgos de fabricación debidos a una actividad del agua demasiado alta y problemas de textura o consistencia por una proteólisis muy intensa (Ventanas, 2003). Se puede reducir la salinidad prolongando los tiempos de post-salado a bajas temperaturas aunque sin bajar de unos límites del 4% para evitar problemas de texturas excesivamente blandas sobre todo en productos destinados al loncheado.

Ahrens y col. (1954) establecieron evidencias claras acerca de la importancia del nivel de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados para la disminución del riesgo cardiovascular. Posteriormente se han llevado a cabo numerosos estudios al respecto, la mayoría de los cuales han confirmado los efectos cardiosaludables estos ácidos grasos, atribuyéndose a los omega-3 los mayores beneficios, (Carrero y col. 2005). Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son funcional y metabólicamente diferentes y provocan efectos fisiológicos opuestos. Ambos son precursores de productos metabólicos como prostaglandinas, tromboxanos, hidroxiácidos y lipoxinas, pero estos productos no se forman en igual medida a partir de los omega-3 y de los omega-6. A partir de los omega 6 se producen en mayores cantidades y son más activos biológicamente pudiendo contribuir a la formación de trombos, ateroma, desordenes alérgicos e inflamatorios y proliferación celular. Los omega- 3 tienen el comportamiento contrario, especialmente los de cadena larga (como el ácido eicosapentaenoico, EPA y el ácido docosahexaenoico, DHA), con efectos claramente beneficiosos. En términos generales, se puede concluir que una relación omega- 6/omega3 inferior a 4 tiene efectos saludables. La salubridad de la dieta puede ser mejorada equilibrando su relación omega-6/omega-3. De forma natural, la mayoría de las carnes poseen una relación omega-6/omega-3 superior a 15. La estrategia más favorable para reducir dicho valor es incorporar a los productos cárnicos la cantidad de PUFA omega-3 necesaria. Para obtener mayor efecto saludable, los omega-3 incorporados deben ser de cadena larga (como EPA y DHA) y dosificarse específicamente según el perfil lipídico del producto concreto. Ya existen patentes que pueden utilizarse en este sentido (Reglero y col. 2004). Además, es imprescindible acompañar la adición de los omega-3 con antioxidantes para protegerlos de la autooxidación durante los procesos de elaboración, para evitar que su ingestión provoque un aumento del estrés oxidativo corporal (Pinchuk y col. 2002). Finalmente para conseguir una sinergia con los omega-3 en su efecto sobre la expresión génica (Demmig-Adams2002).

Los antioxidantes alimentarios más avanzados son extractos de determinadas plantas obtenidos mediante nuevas tecnologías. Los diterpenos fenólicos del romero actúan como antioxidantes primarios y sinérgicos. Concretamente el ácido carnósico y el  $\alpha$ -tocoferol actúan sinérgicamente<sup>16</sup>. Además, a estos extractos de romero se les ha atribuido efectos protectores frente a agentes cancerígenos en pulmón, hígado y estómago Oxford y col. 1997).

Además de por los ácidos grasos poliinsaturados, en los últimos años ha aumentado el interés sobre el ácido linoleico conjugado (ALC) debido a distintos estudios realizados en los que se ha comprobado que el ALC es un compuesto fisiológicamente activo con gran número de efectos potencialmente beneficiosos para la salud. Así, distintos autores han demostrado que el ALC podría ejercer un efecto protector en ratones frente a tumores inducidos y más recientemente se han revisado en profundidad los efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos del ALC, concluyendo que existen más que indicios sobre las propiedades beneficiosas del consumo de este ácido graso para la disminución en la incidencia de este tipo de enfermedades. Además, existen estudios que apuntan a otros efectos positivos del ALC sobre la salud, como efectos protectores contra la arteriosclerosis, o efectos positivos sobre el sistema inmune. Schmid, y col (2006). Han realizado una excelente revisión sobre estos temas.

El incremento de la presencia de estas sustancias en los productos cárnicos tradicionales ya sea mediante la selección genética de los animales productores o mediante su alimentación, constituye uno de los avances más interesantes en la producción cárnica en los últimos tiempos. Asimismo, los estudios sobre la composición química de la carne y los productos cárnicos, utilizando técnicas analíticas más sensibles permiten poner de manifiesto la presencia de estas sustancias. En este caso, la innovación iría en el sentido de transmitir al consumidor los posibles beneficios de esos productos.

En los últimos años el control de calidad de la industria alimentaria y la necesidad de cumplir normativas de seguridad alimentaria cada vez más exigentes ha conducido al desarrollo del sistema de análisis de riesgos y de los puntos críticos de control (ARPCC/HACCP). Este sistema permite identificar riesgos específicos y medidas preventivas para su control, con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos. Es un instrumento para evaluar los riesgos y establecer sistemas de control que se orienten hacia medidas preventivas en lugar de basarse principalmente en el análisis del producto final. El ARPCC puede aplicarse en toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor (FAO-OMS 1993).

La evolución de la economía mundial, la apertura de nuevos mercados, los últimos problemas relacionados con la alimentación (fundamentalmente la BSE) y las exigencias de los consumidores, han fomentado en los últimos años el desarrollo de la trazabilidad para garantizar que un determinado producto cumpla todos los requisitos de seguridad y calidad que se le demandan, es decir, que existe un aseguramiento de su calidad. La necesidad de instaurar sistemas de seguimiento de los productos desde el campo hasta el domicilio del consumidor exige también la innovación de otros sectores como por ejemplo la fabricación de distintos dispositivos electrónicos que permiten almacenar y descargar la información necesaria en el momento que se precise y que deberá estar expresada en un lenguaje adecuado a cada tipo de usuario (controlador, fabricante, consumidor...) para que este pueda obtener la mayor utilidad.

Ya no se trata solamente de elaborar un producto cárnico como lo hacían nuestros antepasados, en la actualidad los industriales deben utilizar todas las herramientas a su alcance para garantizar que su producto tiene el mismo sabor que antaño, pero además que es sano, seguro e incluso con más beneficios dietéticos que el de sus competidores.

### ***Innovación en productos lácteos***

Si es complicado hablar de innovación en productos cárnicos, también resulta difícil hablar de nuevos aspectos del queso en una zona con una larga tradición quesera, como es el sudoeste de la península Ibérica, que según algunos autores se remonta a la edad media. Para salvar esta dificultad vamos a comparar lo que ya se conoce desde hace tiempo, y está claramente asumido y aceptado por todos, con los nuevos estudios que los avances de la ciencia y la tecnología permiten hacer en la actualidad. Además vamos a abordar esta comparación teniendo en cuenta los pros y los contras de cada uno de los puntos tocados.

La leche y sobre todo el queso son alimentos con un elevado contenido proteico. **Las proteínas** constituyen uno de los principales grupos de nutrientes esenciales para la vida y se recomienda una ingesta diaria recomendada 0,6g/kg de peso corporal, constituyendo el queso un aporte de aproximadamente 12,25g de proteína/ 100g de queso.

**Ventajas:** Hoy en día nadie duda de que las proteínas de la leche y por lo tanto las del queso tienen una gran calidad por varios motivos: Aportan prácticamente todos los aminoácidos esenciales que necesita el organismo para sintetizar sus propias proteínas, se digieren fácilmente, se absorben fácilmente y colaboran en la absorción del calcio.

**Inconvenientes:** Actualmente nuestra sociedad consume una cantidad excesiva de proteínas, a lo cual puede colaborar un consumo excesivo de queso, y ese exceso puede traducirse en algunas personas, especialmente sensibles por distintos motivos en diversas alteraciones: Se produzcan problemas de insuficiencia renal por exceso de urea y creatinina, el exceso de ingesta proteica produce una pérdida excesiva de calcio en la orina con lo cual puede ser un factor favorecedor de osteoporosis, también se ha observado en determinados estudios una relación inversa entre la presión arterial y el N eliminado en orina. Por último se ha descrito que muchos quesos contienen sustancias derivadas del metabolismo proteico como las aminas que pueden causar problemas en determinados individuos (histaminosis) con síntomas semejantes a las alergias. La tiramina por ejemplo puede producir un efecto hipertensor. Además en determinados consumidores con tratamientos antidepresivos (inhiben la MAO que metaboliza la tiramina) el consumo de queso puede causar cefaleas, náuseas y vértigos llegando en algunos casos hasta fallos cardíacos.

**Últimos descubrimientos:** La degradación de las proteínas de la leche por acción de los enzimas da lugar a la formación de péptidos y de aminoácidos muchos de los cuales tienen actividades beneficiosas dentro del organismo, de ahí que se denominen péptidos bioactivos. La propia leche contiene péptidos bioactivos de forma natural, pero se ha visto que en los productos fermentados como los yogures y los quesos, estas sustancias se forman también debido a la acción de los enzimas y microorganismos utilizados en su elaboración (coagulación y maduración). En el caso de los yogures y productos similares, los estudios ya están en una fase muy avanzada y de hecho ya forman parte de la publicidad de muchas marcas pero en el caso de los quesos estos estudios se están iniciando. Lo que sí está claro es que la caseína es la principal proteína de la leche de rumiantes y por lo tanto del queso y en los últimos años se han encontrado ocultos en su composición diversos péptidos con actividad fisiológica de los cuales los más conocidos son: **Casomorfina**s péptidos con actividad opioidea, **Casoxinas** y **lactoferroxinas** actividad antagonista de los opioideos, **caseinomacropéptidos** se les atribuyen numerosas funciones biológicas, como ser estimuladores del crecimiento de las bifidobacterias, fuente de ácido sialico que es un nutriente del sistema nervioso central y que también tiene actividad antiviral, fuente de nuevos péptidos con actividad antitrombótica, **Metencefalinas** y otros péptidos pequeños (4-6 aa) que potencian el sistema inmune y pueden tener efecto antimicrobiano, por ejemplo frente a *Staphylococcus aureus*, **Péptidos con actividad antihipertensiva** y **actividad**

**antitrombotica., fosfopeptidos** con capacidad para transportar calcio y otros minerales mejorando así su asimilación.

El suero de quesería también representa una rica y variada mezcla de proteínas que tienen importantes propiedades químicas, físicas y funcionales, además estas proteínas cuando están parcialmente hidrolizadas son fuente de numerosos péptidos con diversas actividades como actividad anticancerosa ya que realizan una función protectora del colon evitando la proliferación celular y potencian la respuesta inmune.

Hasta este momento existen pocos estudios sobre los posibles efectos de los péptidos bioactivos en personas, pero lo que se ha hecho hasta ahora, parece confirmar que los beneficios observados en animales de laboratorio también pueden producirse en humanos y en la actualidad se está investigando mucho sobre la presencia de estas sustancias en leche y sobre la posibilidad de inducir su formación mediante una hidrólisis enzimática selectiva en los distintos productos lácteos.

En los últimos años **las grasas de la leche** y de los productos lácteos han tenido muy mala prensa pero son tan esenciales para la alimentación como los demás nutrientes y se recomienda una ingesta diaria de 1.2g/k de peso corporal de los que el queso aporta 25g/ 100g de queso.

**Ventajas:** Pese a las nuevas tendencias de la alimentación y a lo que promulgan numerosas dietas y regímenes para adelgazar las grasas son totalmente necesarias para el organismo por diversos motivos: Para formar grasas de depósito constituidas por ácidos grasos saturados que sirven como fuente de energía o para la protección de órganos vitales, como grasa estructural que junto con las proteínas forma las membranas celulares, como precursor de ciertas sustancias indispensables para la vida como las prostaglandinas y los leucotrienos y como vehículo de vitaminas. La grasa de la leche y del queso se digiere y absorbe muy bien (hay que recordar que está líquida a la temperatura corporal) y por tanto reúne todas las propiedades que hemos citado y además resulta indispensable para la calidad sensorial del queso influyendo no solo en la textura, sino también en el sabor y el aroma.

**Inconvenientes:** El contenido de grasa aportado por el queso es alto, 2/3 de los ácidos grasos que constituyen las grasas de la leche son saturados con el riesgo que esto supone por estar estos ácidos directamente relacionados con el incremento del colesterol en sangre y por tanto con enfermedades cardiovasculares y por último el contenido en colesterol también es relativamente alto.

**Últimos descubrimientos:** Entre las aplicaciones recientes desde el punto de vista funcional o nutracéutico de los ácidos grasos derivados de la leche están las que derivan del ácido linoleico conjugado ACL. En los diferentes quesos se han encontrado cantidades que oscilan entre los 2.9 y los 5,6mg/g de grasa. Este ácido ha despertado especial interés por sus efectos demostrados en la inhibición del cáncer y la arterioesclerosis y la estimulación del funcionamiento del sistema inmunológico, incluso parece tener una acción importante sobre el control de la diabetes. Se han descrito sorprendentes efectos del ácido butírico en la eliminación de células cancerígenas del colon. Un reciente estudio ha demostrado que la esfingomielina necesaria para prevenir la formación de tumores en animales de experimentación es muy parecida a la que se encuentra en el queso. Se ha descrito una molécula de carácter proteico presente en la leche que tiene efectos sobre el colesterol regulando su absorción. A pesar de la amplia difusión que en los últimos tiempos se ha dado a los beneficios de los ácidos grasos  $\omega 3$  su presencia en los derivados lácteos es muy pequeña aunque podría ser incrementada mediante diversos procedimientos que abarcarían desde la alimentación de los animales (grasas protegidas) hasta el enriquecimiento de la leche.

La presencia de los **hidratos de carbono** en el queso es muy escasa puesto que en su mayor parte desaparece junto con el suero. La ingesta diaria recomendada es muy difícil de

establecer pues está íntimamente relacionada con el gasto energético de los consumidores. El queso aporta aproximadamente 1g/ 100g de queso.

**Ventajas:** Precisamente el bajo contenido en lactosa de los quesos puede constituir una ventaja para aquellos consumidores intolerantes a la lactosa. Los escasos hidratos de carbono que quedan en el queso pueden actuar como promotores de la absorción del calcio y también como promotores del crecimiento de microorganismos prebióticos.

El queso es un alimento muy rico en **minerales** entre los que destaca el calcio cuya ingesta diaria recomendada es de 550mg de los que el queso aporta 600mg/ 100g de queso

**Ventajas:** El contenido en calcio del queso es muy elevado. Aunque una pequeña proporción se elimina con el suero una gran parte se mantiene asociado a las caseínas y es fácilmente absorbido por el organismo. El queso también aporta cantidades importantes de fósforo (IDR=400mg, aporte del queso 500mg) igualmente asociado a las caseínas y de cinc

**Inconvenientes:** El principal inconveniente de los minerales del queso es el elevado contenido en sodio y la relación entre este elevado contenido y la hipertensión arterial. También se ha achacado durante mucho tiempo al calcio del queso un efecto pernicioso para los enfermos renales.

**Últimos descubrimientos:** Las principales novedades referentes a este aspecto se centran en un mejor conocimiento de los niveles de absorción de los distintos minerales y de las interrelaciones entre ellos que permiten formular mucho más cuidadosamente las dietas atendiendo a las necesidades concretas de cada consumidor, por ej. Oxalatos y fitatos (procedentes de verduras y hortalizas) que secuestran el calcio e impiden su absorción. Presencia de otras sustancias que la favorecen (proteínas, lactosa, vitamina D), etc.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- A. Schmid, M. Collomb, R. Sieber and G. Bee. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*, 2006 73, 29-41.
- B. Demmig-Adams, WW. Adams: Antioxidants in Photosynthesis and Human nutrition. *Science* 2002; 298:2149-2153.
- EA. Offord, K. Mace, O. Avanti, AMA. Pfeifer: Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Letters* (1997); 114:275-281.
- EH, Ahrens, DH, Blankenhorn, TT, Tastas: Effect on human serum lipids of substituting plant for animal fat in the diet. *Proc Soc Exp Biol Med* (1954); 86:872-878.
- FAO-OMS. Directrices para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y de los puntos críticos de control. *Codex Alimentarius* 1993;1(supl.1):103-11.
- G. Reglero, P. Frial, FJ. Senorans, E. Ibanez, S. Santoyo, C. Torres, L. Jaime, C. Soler, M. Rodriguez, F. Marin, A. Rodriguez: Mezcla oleosa de ingredientes bioactivos naturales para la preparacion de un producto alimenticio enriquecido. Patente P200402755. (2004).
- I. Pinchuk, D. Lichtenberg: The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progr Lipid Res* 2002; 41:279-285.
- J. Ventanas (ed.) *Avances en la Ciencia Tecnología y Comercialización del Jamón*. Conjamon, Cáceres (2003)
- JJ. Carrero, E. Martin-Bautista, L. Baro, J. Fonolla, J. Jimenez, JJ. Boza, E. Lopez-Huertas: Efectos cardiovasculares de los acidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su su ingesta” *Nutrición Hospitalaria* 2005 ; XX(1) : 63-69
- R. López-Fandiño, J. Otte and J. van Camp: Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity *International Dairy Journal*, 2006, 11, 1277-1293
- C. Thomä-Worringer, John Sørensen and Rosina López-Fandiño: Health effects and technological features of caseinomacropptide. *International Dairy Journal*, 2006, 1, 1324-1333

# APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLECTÂNCIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS) AO ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DA GORDURA SUBCUTÂNEA DORSAL DO PORCO ALENTEJANO

*Oliveira, A.R. \*<sup>1</sup>.; Chaso Criado, M.A. <sup>2</sup>.; Fernandes, R.M.C.S.C.<sup>1</sup> & Medina, P.L.R <sup>2</sup>.*

<sup>1</sup> Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico Beja e <sup>2</sup> Faculdade Veterinária da Universidade Extremadura

<sup>1</sup> Rua Pedro Soares,, 7801-908 Beja

Tel +351-284 314 300 Fax +351-284 388 207 e-mail: [aro@esab.ipbeja.pt](mailto:aro@esab.ipbeja.pt)

**Palavras chave:** Porco Alentejano, Ácidos Gordos, Análise NIRS, Agrupamento por Características Espectrais.

## RESUMO

A aplicação da técnica NIRS ao estudo da gordura subcutânea foi feita com um duplo objectivo: **a)** possibilidade de analisar o perfil de ácidos gordos como alternativa à Cromatografia Gasosa convencional; **b)** possibilidade de agrupar os animais a partir das características espectrais das suas gorduras em grupos de acordo com a alimentação recebida.

A supracitada técnica foi aplicada a 60 porcos divididos em três lotes conforme o manejo alimentar: ração comercial, montanheira suplementada com milho e montanheira suplementada com tritcale.

Em relação ao primeiro objectivo, o êxito dos modelos desenvolvidos foi escasso. No trabalho discute-se a possibilidade de que este facto se deva à pequena variabilidade de cada um dos ácidos gordos estudados.

Contudo, o processo de agrupamento dos animais em função do espectro da sua gordura resultou promissor, visto que nos permitiu diferenciar os animais do lote mais característico de montanheira, dos restantes.

**Key words:** Alentejo pig, Fatty acids, NIRS Analysis, Gathering after spectral Characteristics.

## ABSTRACT

The application of the NIRS technique to the study of the subcutaneous fatness was performed with a double purpose: **a)** the possibility of analysis of the fatty acids profile as an alternative to the conventional Gas Chromatography; **b)** the possibility of grouping animals according spectral characteristics of their fatness in groups according to the administered feeding.

The aforementioned technique was performed to 60 pigs divided in three groups according to the feeding management: compound feed, “montanheira” plus maize and “montanheira” plus tritcale.

As to the first purpose, the success of the developed model was scarce. In this study it is discussed the possibility of this fact being due to less variability from each one of the studied fatty acids.

However, the animal grouping process according to the spectrum of their fatness revealed a promising result once that it allowed us to differentiate the animals of the more specific pasture group from the others.

Finally we proceeded to the application of the Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the Study of the composition of the subcutaneous dorsal fatness from the Alentejo pig breed and verified the scarce exit of models developed. However, the process of grouping animals according to the spectrum of their fatness resulted promising, once it allowed us to differentiate the most typical group of animals from pasture.

## 1 – INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos a técnica *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)*, tem sido aplicada à análise de vários produtos alimentares e não alimentares, por ser uma técnica menos onerosa e mais rápida que as técnicas mais tradicionais como as análises de proximidades (próximas) convencionais, Cromatografia Gasosa, etc.

Lobo (1993), De Pedro (1999) e Garrido *et al* (2000), utilizaram a supracitada técnica para caracterização de carcaças, da gordura subcutânea, do lombo e do presunto fresco do porco Ibérico, desenvolvendo modelos para o estudo dos ácidos gordos. Além disso, González (1997), aplicou a técnica *NIRS* ao estudo das gorduras subcutânea e perirrenal do porco Ibérico com distintos maneios alimentares, com a finalidade de agrupar os lotes de animais em função do maneio alimentar.

Também Garrido *et al* (1996), González (1997), López-Peláez (1998), Garcia *et al.* (1998), Garcia, (1999), Rodríguez & Hermida (1996), Rodríguez *et al* (1995, 1997a, 1997b e 1998) e Rodríguez (1999) e Garrido *et al* (2000), usando a mesma técnica, caracterizaram produtos para alimentação humana, animal e também produtos não alimentares .

A referida técnica permite a análise de amostras directamente ou após trituração e fusão em estufa ou microondas, não necessitando de outras operações ou reagentes.

Para finalizar, convém referir que esta técnica é bastante utilizada actualmente porque a obtenção dos resultados é rápida e a não utilização de reagentes orgânicos evita a rejeição de resíduos poluentes.

## 2 - OBJECTIVOS

Neste trabalho propomos dois objectivos concretos:

- 1 - Determinação da composição e do perfil dos ácidos gordos da gordura subcutânea dorsal do porco Alentejano pela técnica *NIRS* .
- 2 - Agrupamento dos animais em estudo em função das características espectrais da gordura na região *NIRS*, segundo o maneio alimentar a que foram sujeitos na fase de engorda.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 – Amostras

Utilizámos um total de 60 amostras de gordura subcutânea dorsal, provenientes dos três lotes de animais descritos anteriormente (Quadro I). A recolha de amostras foi efectuada na carcaça dos animais em estudo após abate e enxugo, a nível da região anatómica da espádua, na manta de toucinho da gordura subcutânea.

### 3.2 - Análise Cromatográfica dos Ácidos Gordos

A identificação dos ácidos gordos foi efectuada mediante a técnica de Cromatografia Gasosa (CG). Assim sendo, cada amostra da gordura, foi triturada, homogeneizada e liquefeita numa estufa termostática a 60 °C e após filtração foi recolhida, de seguida procedeu-se à extracção da gordura de cada amostra em estudo, através da adição de éter de petróleo de qualidade analítica. A partir da gordura assim obtida (300 mg) procedeu-se de seguida à extracção dos ésteres metílicos através da adição de 0,5 ml de uma solução de hidróxido de potássio em metanol 2N e de 1 ml de heptano. Em seguida agita-se bem o frasco e recolhe-se a parte sobrenadante da mistura da amostra onde se encontram concentrados os ésteres metílicos.



Estes são injectados (volume da amostra injectada foi 0,3 µl) no Cromatógrafo de Gases *Hewlett Packard* (HP) modelo 5890, Séries II, equipado com um injector *split-splitless* e um detector de ionização de chama (FID), que utiliza uma coluna capilar SGE, 25QC2/BP20 de 25 m de comprimento, 0,22 mm de diâmetro interno, 0,25 µ de espessura de filme e uma fase estacionária de sílica de BP20. As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injector 250 °C, temperatura do detector 240 °C e temperatura do forno (inicial 160 °C, rampa 4 °C/minuto e final 220 °C). Os dados foram recolhidos e processados por um integrador acoplado a um *Software CHERMSTATION*.

A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos, com os de uma mistura padrão da composição conhecida.

### 3.3 – Espectrofotometria de Refletância no Infravermelho Próximo (NIRS)

A técnica de espectrofotometria *NIRS*, com varrimento, utiliza um intervalo de comprimento de onda de 1100 nm a 2500 nm com um intervalo de leitura de 2 nm, correspondendo portanto a um total de 701 pontos espectrais. O aparelho utilizado foi o *NIRS - InfraAlyzer 500, Bran+Lüebbe*, Alemanha .

Cada amostra de gordura, foi homogeneizada com picadora eléctrica de cuba (*moulinex*). Foi depois fundida por aquecimento em estufa a 60 °C, filtrada por gases para eliminar os restos ganglionares, tecido conjuntivo, etc.

Após o arrefecimento da amostra de gordura, esta foi introduzida com auxílio de uma espátula em cápsulas de produtos pastosos (*Bran+Lübbe*) de acordo com a metodologia utilizada por González (1997). Para evitar a possível acção da temperatura sobre a qualidade do espectro obtido, cada cápsula foi mantida em câmara frigorífica até ao início da execução do espectro.

### 3.4 – Calibração e Análise Estatística

Para execução do processo de calibração do aparelho, utilizou-se um modelo de regressão multivariante mediante a equação dos mínimos quadrados parciais (PLS) (Martens & Naes, 1989). Fez-se o ajustamento do modelo matemático obtido em termos de percentagem da variância explicada através do modelo ( $R^2$ ) e do erro padrão de calibração (EPC), que deve ser mínimo.

A obtenção de espectros foi realizada com o programa IDAS (Bran+Lübbe, 1989), e a regressão multivariante (PLS) foi efectuada pelo programa *UNSCRAMBLER V5.0* (Camo, 1993). O número óptimo de factores adequados para cada modelo é o indicado pelo próprio programa, através de um processo de validação cruzada em que o total de amostras se divide em oito subconjuntos ( $8 \approx \sqrt{60}$ ) (Shenk & Westerhaus, 1993) .

Como tratamento prévio dos dados espectrais utilizámos tanto os espectros originais como os submetidos a uma correcção multiplicativa do sinal (MSC) para reduzir o efeito do ruído espectral (Martens & Naes, 1989), como se pode observar na Figura 1.

No Quadro II apresentamos um resumo do valor das variáveis analisadas (percentagem de cada ácido gordo).

Posteriormente efectuámos uma análise de componentes principais nos espectros obtidos, retendo as *n* primeiras componentes principais capazes de explicar 100 % da variabilidade espectral (Martens & Naes, 1989). As coordenadas de cada amostra nas *n* primeiras componentes principais foram utilizadas como variáveis de entrada na análise de agrupamento de *Cluster*.

O método de agrupamento adoptado foi o denominado de *Ward*. O referido procedimento de agrupamento tem por base fundamental o cálculo da média de todas as variáveis de cada

grupo e as somas das distâncias euclidianas ao quadrado entre cada indivíduo e a média do seu grupo. Os blocos ou grupos formados são aqueles que apresentam um menor valor da soma das distâncias ao quadrado *intra-cluster*. O programa estatístico utilizado para esta análise foi o SPSS Versão 10.0 (SPSS, 2000).

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das calibrações, com os dados originais e com os dados corrigidos com MSC encontram-se apresentados no Quadro III.

Verificámos que apenas um par de resultados atinge valores superiores a 75 % de variância explicada conforme o preconizado pela AOAC (1995), para ser aceite como válida a aplicação da técnica *NIRS*.

Assim, os resultados obtidos para os ácidos margárico e linoleico, poderão estar sobreestimados pelo modelo utilizado por serem ácidos gordos minoritários, o que dificulta de forma evidente o processo de calibração.

Por isso, torna-se obrigatório a comparação destes resultados com os resultados obtidos por González (1997), autora que obteve os modelos mais adequados à definição da qualidade da gordura do porco Ibérico, nomeadamente: palmítico, esteárico, oleico e linoleico.

Com os nossos resultados não foi possível cumprir a exigência do modelo, provavelmente porque houve uma menor variabilidade (número a negrito), quando comparamos com a dos resultados de González (1997) (número normal). Comparando o desvio padrão para os ácidos gordos palmítico (1,75–2,77), esteárico (1,29–2,47) e oleico (1,68–4,24), torna-se evidente a menor variabilidade dos nossos resultados.

Mais difícil de explicar é o facto do modelo não se ter cumprido com os resultados por nós obtidos para o ácido linoleico que apresenta uma variabilidade maior (2,07) que a obtida por González (1,70) em que o modelo se cumpriu.

Por isso, pensamos que a pequena variabilidade dos ácidos gordos maioritários provoca um sinal espectralmente confuso que impede, de forma geral, o processo de calibração, sendo de facto um fenómeno semelhante ao já descrito por González (1997) com a gordura cavitária (gordura perirrenal), que possui menor variabilidade na sua composição.

Em função de todos estes resultados não faz sentido elaborar modelos para outros valores associados ao perfil de ácidos gordos tais como o total de saturados, de insaturados, de monoinsaturados e diferentes relações entre eles. Um exemplo do resultado obtido, encontra-se na Figura 2.

No entanto os resultados de análise de *Cluster*, para o perfil espectral da gordura, mostram uma clara tendência para separar os animais do lote 3 em relação aos restantes dois lotes estudados.

Os resultados correspondentes aos espectros originais (Gráfico 1), apresentam-se divididos em três grupos a uma distância de corte relativamente precoce (Distância 5) e é visível o facto de que os animais pertencentes ao lote 3, cujo perfil de ácidos gordos é o mais semelhante ao da montanheira, se encontrarem agrupados, embora apareçam misturados com animais provenientes dos outros lotes, enquanto, que os outros lotes (1 e 2) de animais em estudo, aparecem repartidos de forma aparentemente aleatória entre os três grupos formados.

Estes resultados confirmam os descritos previamente em relação à dificuldade espectral existente no nosso caso, visto que González (1997) encontra uma boa capacidade de separação, para porcos engordados exclusivamente em montanheira, em que a gordura é muito rica em ácido oleico.

O agrupamento proporcionado pelos espectros sujeitos ao tratamento de correção por MSC (Gráfico 2) é igualmente elucidativo ao formarem-se claramente três grupos no corte à distância 5 no dendrograma. No entanto a organização interna destes grupos é claramente inexistente, visto que há representantes de animais de todos os lotes em cada um dos ditos grupos. Este resultado confirma o obtido anteriormente por González (1997), tendo em conta que a correção multiplicativa do sinal espectral (MSC) é um tratamento pouco adequado, quando pretendemos estabelecer modelos de agrupamento das amostras a partir das suas características espectrais. Portanto, o mais aconselhável é trabalhar com os dados espectrais originais.

## 5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais ensaiadas, concluímos que:

- 1 – O processo de calibração *NIRS* foi limitado devido ao escasso intervalo dos valores obtidos para a composição de ácidos gordos.
- 2 – De acordo com o anterior, o agrupamento de animais em função das características espectrais da sua gordura subcutânea dorsal ficou limitado. Apesar disso, há uma tendência de agrupamento dos animais pertencentes ao lote com características de gordura mais semelhante aos da montanheira.

## 6 – BIBLIOGRAFIA

Os Autores enviarão aos interessados a Bibliografia através de solicitação pelo seguinte e-mail: [aro@esab.ipbeja.pt](mailto:aro@esab.ipbeja.pt)

## 7 – QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS

### Quadro I – Desenho Experimental com Porcos Alentejanos

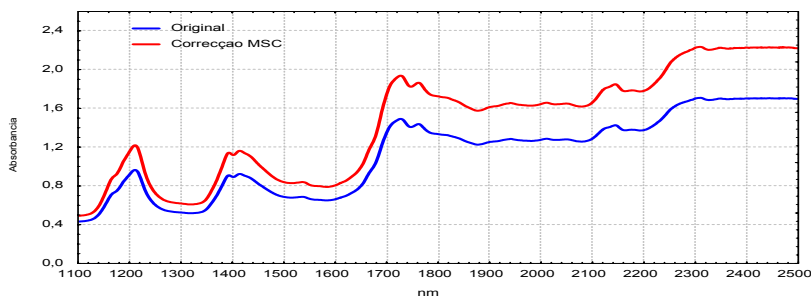
| DESIGNAÇÃO                           | LOTE-1                | LOTE-2     | LOTE-3       | TOTAL |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|--------------|-------|
| N.ºTotal de Amostras Gorduras GSD    | 24                    | 24         | 12           | 60    |
| Sistema de Exploração                | Intensivo ao Ar Livre | Extensivo  | Extensivo    | --    |
| Tipo de Alimentação ( <sup>1</sup> ) | RC- 852               | Mn + Milho | Mn+Triticale | --    |

GSD – Gordura Subcutânea Dorsal. RC-852 - Ração Comercial-852. ( <sup>1</sup> ) - O Tipo de Alimentação refere-se apenas à fase de engorda dos porcos. Mn - Recursos alimentares locais disponíveis na Montanheira (bolota, erva, etc.) .

### Quadro II - Estatística descritiva dos ácidos gordo da gordura subcutânea dorsal das carcaças estudadas (n = 60)

| ÁCIDO GORDO          | MÉDIA | Desvio Padrão | Valor Máximo | Valor Mínimo |
|----------------------|-------|---------------|--------------|--------------|
| C14:0 Mirístico      | 1,62  | ± 0,25        | 2,2          | 1,0          |
| C16:0 Palmítico      | 25,38 | ± 1,75        | 28,3         | 21,5         |
| C16:1 Palmitoleico   | 2,27  | ± 0,34        | 2,9          | 1,3          |
| C17:0 Margárico      | 0,41  | ± 0,13        | 1,00         | 0,2          |
| C17:1 Heptadecenoico | 0,36  | ± 0,08        | 0,6          | 0,2          |
| C18:0 Estearico      | 12,90 | ± 1,29        | 16,30        | 10,50        |
| C18:1 Oleico         | 47,38 | ± 1,68        | 50,8         | 43,6         |
| C18:2 Linoleico      | 4,93  | ± 2,07        | 8,9          | 1,1          |
| C18:3 Linolenico     | 0,24  | ± 0,15        | 0,7          | 0,04         |
| C20:0 Araquídico     | 0,22  | ± 0,05        | 0,3          | 0,1          |
| C22:0 Beenico        | 0,45  | ± 0,38        | 1,6          | 0,00         |
| C22:1 Erúxico        | 0,39  | ± 0,37        | 1,5          | 0,00         |

Figura 1 - Curvas espectrais. Comparação entre os espectros original e corrigido por MSC da gordura subcutânea dorsal fundida

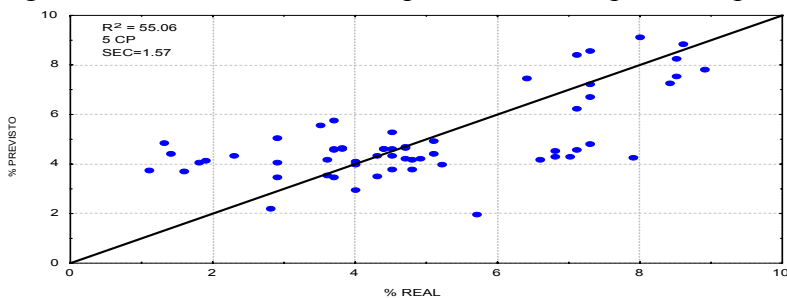


**Quadro III – Resultados obtidos da calibração NIRS para os diferentes ácidos gordos analisados: Percentagem de variância explicada (número de factores), SEC**

| ÁCIDO GORDO          | Aplicação do Modelo com Dados Originais | Aplicação do Modelo após Correção com MSC |
|----------------------|---|---|
| C14:0 Mirístico      | 55,95 (6) 0,21                          | 21,63 (2) 0,24                            |
| C16:0 Palmítico      | 42,92 (4) 1,43                          | 45,45 (3) 1,43                            |
| C16:1 Palmitoleico   | 23,93 (5) 0,32                          | 15,97 (3) 0,32                            |
| C17:0 Margárico      | 80,55 (9) 0,11                          | 47,05 (3) 0,11                            |
| C17:1 Heptadecenoico | 39,50 (5) 0,07                          | 41,28 (4) 0,07                            |
| C18:0 Estearico      | 27,75 (5) 1,15                          | 22,07 (4) 1,24                            |
| C18:1 Oleico         | 12,34 (2) 1,62                          | 8,86 (1) 1,65                             |
| C18:2 Linoleico      | 55,06 (5) 1,57                          | 18,19 (3) 1,53                            |
| C18:3 Linolenico     | 63,35 (5) 0,10                          | 90,99 (9) 0,08                            |
| C20:0 Araquídico     | 0,00                                    | 0,00                                      |
| C22:0 Beenico        | 38,73 (5) 0,32                          | 33,50 (3) 0,35                            |
| C22:1 Erúico         | 13,26 (1) 0,36                          | 14,28 (2) 0,36                            |

NOTA: A negrito encontra-se indicado o melhor modelo para cada caso .

Figura 2 - Resultados reais comparados com os previstos para o ácido linoleico



# ESTUDOS SOBRE UM NOVO INIBIDOR DO ABROLHAMENTO: O COMPOSTO DE INCLUSÃO DE $\beta$ -CICLODEXTRINA E S-CARVONA

Costa e Silva<sup>1</sup>, M.; Gomes<sup>5</sup>, M.; Galhano<sup>2,3</sup>, C.I.C.; Cruz<sup>5</sup>, L.; Moreira da Silva, A.M.G. \*<sup>1,4</sup>

Escola Superior Agrária de Coimbra, Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentar<sup>1</sup>,  
Departamento de Ciências Exactas e do Ambiente<sup>2</sup>, Bencanta, 3040-316 Coimbra  
<sup>3</sup>Unidade de Investigação CERNAS, Bencanta, 3030-316 Coimbra; <sup>4</sup>Unidade de Investigação Química  
Física Molecular, Universidade de Coimbra, 3030-535 Coimbra  
<sup>5</sup>Sociedade Industrial de Aperitivos, Além do Mourão 3140-580 Tentúgal  
Tel.: +351-239-802275; fax +351-239-802273 e-mail: [aidams@esac.pt](mailto:aidams@esac.pt)

**Palavras-chave:** antiabrolhante, batata, carvona,  $\beta$ -ciclodextrina, composto de inclusão

**Resumo:** O trabalho apresentado tem como principal objectivo o desenvolvimento de um novo inibidor do abrolhamento em batata (*Solanum tuberosum* L.). Foram realizadas extracções do óleo essencial de “sementes” (frutos) da alcarávia (*Carum carvi* L.), cujo componente principal é o monoterpene S-carvona, através de hidrodestilação e extracção super crítica. Foi também sintetizado um composto de inclusão baseado em ciclodextrina e S-carvona (rendimento ca. de 95% (m/v)) através do método de precipitação. Estes dois sistemas, a S-carvona e o composto de inclusão foram testados quanto à actividade inibidora do abrolhamento em batata, sendo comparados com o antiabrolhante vulgar, o clorprofame, e uma testemunha sem qualquer tratamento antiabrolhante. Numa primeira fase, estes ensaios foram desenvolvidos em pequena escala, utilizando 70 tubérculos por cada tratamento. Numa segunda fase, os ensaios decorreram à escala industrial, numa empresa alimentar de batata frita. Estes estudos indicaram haver uma actividade antiabrolhante do novo sistema utilizado, composto de inclusão carvona/ $\beta$ -ciclodextrina (CI<sub>carv/ $\beta$ -CD</sub>).

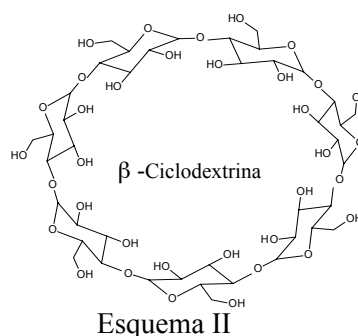
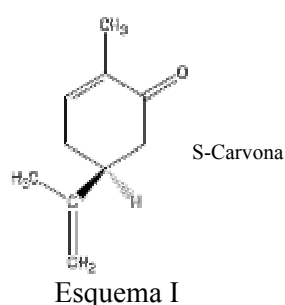
Na fase final do estudo, foram realizadas provas de análise sensorial à batata frita. Os resultados obtidos através da realização de testes triangulares indiciam não haver diferenças no produto final, independentemente dos diferentes tratamentos.

## 1. INTRODUÇÃO

O abrolhamento é a maior causa de perdas durante o armazenamento de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.). Existem dois métodos principais para evitar o abrolhamento durante o armazenamento: armazenar a baixas temperaturas (2 a 4 °C) ou utilizar inibidores de abrolhamento<sup>[1]</sup>. O armazenamento a baixas temperaturas causa a degradação do amido, aumentando o teor de edulcorantes no tubérculo, reduzindo a qualidade para a utilização industrial (e.g. para fabrico da batata frita). O controlo do ambiente através da redução da concentração de O<sub>2</sub> e aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, apesar de funcionar como inibidor do abrolhamento, também origina defeitos fisiológicos no tubérculo. Dentro de um número significativo de compostos químicos conhecidos pela actividade antiabrolhante é o clorprofame (CIPC), 3-clorfenilcarbamato de isopropilo, o composto que mais tem sido utilizado pelas entidades que armazenam batata<sup>[2]</sup>. Nos países escandinavos a utilização de CIPC foi restringida, devido a impactos negativos para a saúde e para o ambiente, sendo tendência dos restantes países europeus a proibição da utilização destes produtos químicos sintéticos, cuja segurança tem vindo a ser discutida pelo comité fitossanitário permanente da Comunidade Europeia<sup>[3]</sup>. No entanto, existe a possibilidade de se utilizar um componente de um óleo essencial, extraído das sementes de alcarávia, vulgarmente designado por carvona (o enantiómero da forma S-(+),- p-menta-6,8-dieno-2-ona) como agente antiabrolhante de batata, tal como foi utilizado pelos povos da civilização Inca<sup>[1]</sup>. A carvona (Esquema I) inibe

reversivelmente o abrolhamento da batata. Resultados experimentais demonstraram haver aumento da produção da batata quando a carvona foi utilizada na batata semente antes da sementeira [4]. Ou seja, esta característica torna possível a utilização deste inibidor de abrolhamento da batata, sem no entanto prejudicar a futura sementeira do tubérculo, podendo inclusive, aumentar a produção. Mais ainda, a carvona reduz o desenvolvimento e o crescimento de inimigos da cultura em armazenamento [1,5]. A carvona, é um produto orgânico natural que possui um enorme potencial para vir a substituir os compostos químicos sintéticos inibidores do abrolhamento [6]. Actualmente, em Portugal, são produzidas 528108 toneladas de batata, sendo grande parte mantida em armazém até à venda ou até ao processamento [7]. Estima-se que durante o armazenamento é dispendida cerca de meia tonelada de antiabrolhante, usualmente clorprofame.

No método natural alternativo apresentado neste trabalho experimental, o antiabrolhante orgânico, a carvona possui o estatuto de GRAS ("Generally Recognized as Safe") nos Estados Unidos da América e foi autorizada a sua utilização pela União Europeia em 2002 [3]. Sendo a carvona um composto no estado líquido à temperatura ambiente, existem algumas dificuldades práticas associadas à aplicação em grandes quantidades de batata armazenadas. Uma alternativa é inclusão da carvona em ciclodextrina, obtendo-se um pó cristalino de fácil aplicação.



A ciclodextrina (Esquema II) é um oligossacárido cíclico constituído por 6,7 ou 8 unidades de glucose ligadas entre si, possuindo uma característica particular - a formação de compostos de inclusão. Os compostos de inclusão baseados em ciclodextrina permitem a libertação controlada das moléculas incluídas destacando-se duas grandes vantagens: a estabilização e o aumento da solubilidade [8,9].

Neste artigo é apresentado o trabalho cujo principal objectivo foi avaliar o efeito antiabrolhante da aplicação da carvona na forma de composto de inclusão carvona/ $\beta$ -ciclodextrina (CI<sub>carv/ $\beta$ -CD</sub>), à escala industrial, em condições quase práticas.

## 2. METODOLOGIA

A  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -CD (Kleptose) foi gentilmente oferecida pela Roquette, França, a S-carvona (2-metil-5-(1-metiletlenil)-2-ciclohexen-1-ona) (Esquema I) foi adquirida à Aldrich e o Talent® foi oferecido pela Luxan.. A S-carvona foi também extraída a partir das “sementes” de *Carum carvi* L. (alcarávia) através de extracção supercrítica e/ou hidrodestilação (2.2-2.9 g/100g de sementes desidratadas) [10,11]. O CIPC, Batalex Novo® foi adquirido à Sapec Agro.

### 2.1. Preparação do composto de inclusão à escala piloto.

A  $\beta$ -CD, 273 g, foi dissolvida em 15 L de água destilada até à obtenção de uma solução límpida, (a 353K) num fermentador *B. Braun Biotech Biostat ED DCU2*. A S-carvone (37,7 ml) foi adicionada gota-à-gota à solução de  $\beta$ -CD. A mistura foi vigorosamente agitada

durante a noite até ser atingida a temperatura ambiente. Os cristais brancos foram filtrados e secos durante 1 a 2 dias sob a atmosfera ambiente (rendimento *c.a.* 90%(m/m)).

O composto de inclusão  $\beta$ -CD/carvona foi caracterizado através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão ( $^1\text{H-NMR}$ ) e Espectroscopia de Raman [5,6].

## 2.2 Experiências no armazenamento da Batata

A batata utilizada nas experiências de avaliação da actividade antiabrolhante foi produzida nos campos de ensaio preparados na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) e na Cooperativa Agrícola dos Lavradores do Concelho de Oliveira do Bairro (CALCOB).

### 2.2.1. Experiência Preliminar em 2004

O ensaio preliminar decorreu num período de seis semanas. Foram utilizados cinco recipientes de madeira com 70 x 50 cm, distanciados 15 cm, entre si. Em cada recipiente, foram colocados numa única camada, 70 tubérculos (cv. Monalisa), com o peso médio de 140g, de modo a perfazer aproximadamente 10 kg. Os tubérculos de cada recipiente foram submetidos a quatro tratamentos distintos tendo um dos recipientes servido de testemunha. Os quatro tratamentos testados foram: aplicação de 6 ml de S-(+)-carvona por aspersão uniformizada dos tubérculos, uma vez por semana; distribuição homogénea de 25g de composto de inclusão (carvona/ $\beta$ -ciclodextrina) pelos tubérculos, uma vez por semana; aplicação única homogénea de 10 g de CIPC; aplicação única homogénea de 337g de sementes de alcarávia distribuídas pelos tubérculos. Os recipientes dos tratamentos acima indicados foram colocados numa câmara frigorífica, com uma temperatura de 10°C, humidade relativa de 80-90% e no escuro. O recipiente destinado à testemunha foi colocado numa câmara frigorífica distinta, sob as mesmas condições da anterior, de modo a isolar os tratamentos da testemunha. Nas câmaras frigoríficas foram colocados termómetro/higrómetro de modo a registar as variações das condições de temperatura e humidade relativa. As observações foram efectuadas semanalmente tendo-se registado o número de tubérculos com rebentos (brochos) e o seu comprimento, em cada tratamento e na testemunha. Esses valores foram posteriormente transformados em percentagens de abrolhamento, relativamente ao número total de tubérculos (70) de cada tratamento e da testemunha.

### 2.2.2. Experiência em 2005-2006

O ensaio decorreu durante 18 semanas. Foram testados quatro tratamentos: carvona; composto de inclusão; clorprofame e sementes de alcarávia (Tabela 2). Para isso, utilizaram-se sacos de grande porte, *Bigbags*, onde foram colocados 77 kg de tubérculos (cv. Agria) de calibre 40-80mm. A carvona e o composto de inclusão foram aplicados, quinzenalmente, de forma homogénea por todos os tubérculos; o clorprofame foi aplicado com intervalo de 2 meses; as sementes de alcarávia foram administradas apenas no início do ensaio, numa aplicação única. A um *Bigbag* com a mesma quantidade de tubérculos não foi administrado qualquer tratamento (testemunha).

**Tabela 2** – Delineamento do ensaio nas câmaras frigoríficas

| <i>Tratamento</i>     | <i>Quantidade por aplicação</i> | <i>Quantidade total aplicada</i> |
|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Carvona               | 42,6 ml                         | 277,2 ml                         |
| Composto de Inclusão  | 200,2 g                         | 1201,2 g                         |
| Clorprofame           | 77g                             | 231 g                            |
| Sementes de Alcarávia | ---                             | 2595 g                           |

Os *Bigbags* foram colocados em câmaras frigoríficas, a 10°C, com humidade relativa de 80-90% e no escuro. Para evitar efeitos cruzados entres os tratamentos, os tratamentos

S-carvona, composto de inclusão e sementes de alcarávia decorreram numa câmara e o tratamento com clorprofame e a testemunha noutra câmara com as condições da anterior.

As observações foram quinzenais tendo sido avaliado o número e o respectivo comprimento dos rebentos, numa amostra aleatória de 10 tubérculos, em cada tratamento e na testemunha. Como informação adicional foram monitorizadas as condições de temperatura e humidade relativa das câmaras frigoríficas em “dataloggers”.

### **2.2.3. Experiência de Setembro a Dezembro 2006 (Sociedade Industrial de Aperitivos)**

Foi ainda realizado um ensaio de armazenamento de 2,4 toneladas de tubérculos (cv. Hermes), à escala industrial em condições quase práticas nas instalações de uma empresa alimentar de batata frita, parceira do projecto AGRO 691, a Sociedade Industrial de Aperitivos – S&A, Lda. Foram utilizados contentores de madeira, com capacidade para 600 kg de tubérculos. A aplicação dos diferentes tratamentos nos tubérculos foi efectuada quando estes passaram por tapetes rolantes usados para a recepção e triagem dos tubérculos, antes de serem colocados nos contentores de madeira. Nesta fase, os tratamentos foram administrados da seguinte forma: a carvona, sob a forma de solução (360 mL), Talent<sup>®</sup>, foi pulverizada por meio de um equipamento de ar comprimido, de modo a conseguir diminuir ao máximo o tamanho das gotículas do produto; o composto de inclusão (9360 g) e o CIPC (600 g) foram distribuídos com o auxílio de um crivo, de forma homogénea. Os contentores foram colocados na câmara de armazenamento a  $12\pm 1^\circ\text{C}$  e a 90%, por um período de 10 semanas. Durante esse período foram monitorizados os tratamentos, observadas as alterações (aparecimento de possíveis doenças e pragas de armazém) e contabilizado o abrolhamento através da medição de rebentos numa amostra aleatória de 10 tubérculos, para cada tratamento e para a testemunha. As observações foram feitas semanalmente. De seguida, foi delineado o processo de fritura e o embalamento em linha de produção contínua. Os tratamentos e a testemunha foram processados nas mesmas condições, tendo como resultado final batata frita ondulada em pacotes de filme metalizado de 200 g, condicionados em caixas de cartão de 16 pacotes, e posteriormente colocados em “paletes”.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

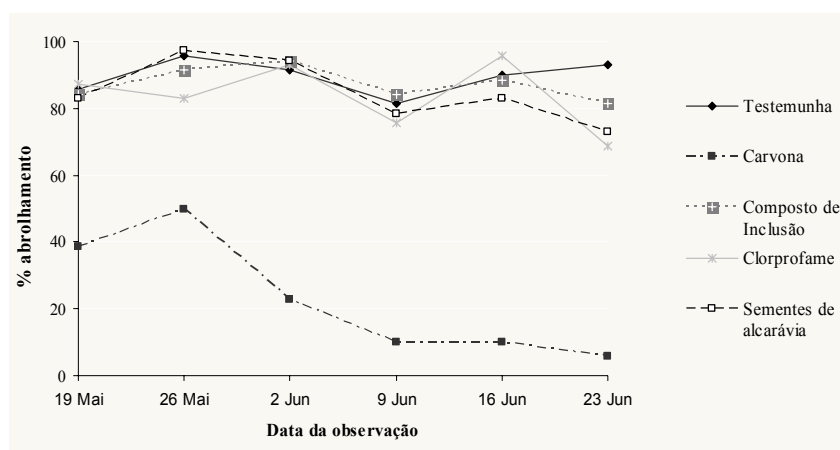
A estequiometria do composto de inclusão e a sua constante de inclusão aparente ( $K_{ap}$ ) foram anteriormente determinadas através do método das variações contínuas (método “Job”). A constante de associação aparente para uma inclusão de S-(+)-carvona em  $\beta$ -ciclodextrina de 1:1 é de  $1330 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $cv = 10\%$ ), a  $286\text{K}$  [7].

No que respeita aos resultados obtidos na experiência preliminar (Figura 1), a carvona foi o tratamento onde se observou o efeito de inibição do abrolhamento mais evidente, à semelhança do que tem sido referido na literatura [1,4]. No entanto, o composto de inclusão mostrou indícios de uma actividade inibidora do abrolhamento quando comparado com a testemunha.

Nos estudos de 2005-2006, de entre os tratamentos efectuados, o composto de inclusão foi o que mostrou o efeito antiabrolhante mais notório, seguido do clorprofame e das sementes de alcarávia (Figura 2). Não foi possível apresentar os resultados referentes à carvona, já que os tubérculos apodreceram, provavelmente devido à forma de aplicação do tratamento que terá criado o ambiente de humidade favorável ao aparecimento de agentes patogénicos.

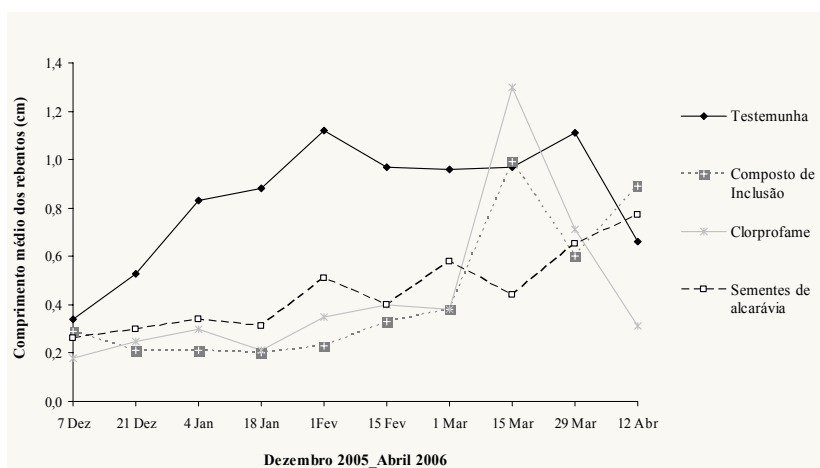
Relativamente ao ensaio efectuado à escala industrial, em condições quase práticas, (Figura 3), os resultados obtidos mostram que o composto de inclusão parece ser uma alternativa promissora à utilização do clorprofame, como um tratamento adequado para impedir o abrolhamento.





**Figura 1** – Abrolhamento dos tubérculos (%) observado em cada tratamento e na testemunha durante o período do ensaio preliminar (Maio e Junho de 2004).

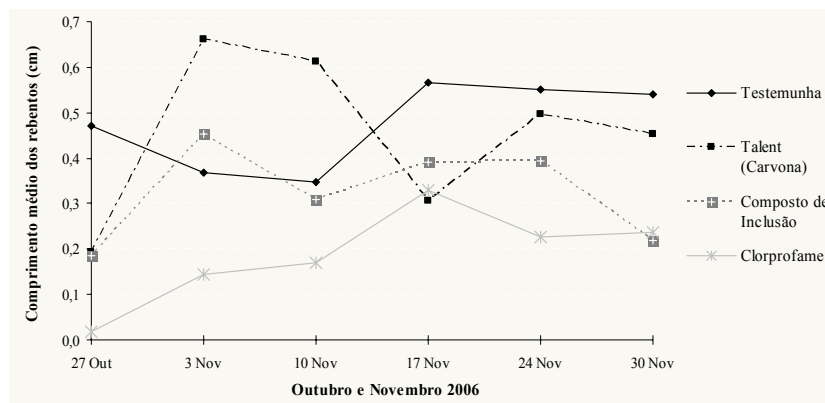
Considerando que o clorprofame, ao interferir com a divisão celular, apresenta indícios de ser prejudicial, tanto para a saúde como para o ambiente, e tendo a sua utilização já sido restringida nalguns países, torna-se imperioso procurar alternativas viáveis que permitam evitar um dos maiores problemas da conservação de batata em armazém, o abrolhamento <sup>[11]</sup>.



**Figura 2** – Comprimento médio dos brotos (cm) observados nos tubérculos de cada tratamento e na testemunha durante o período de estudo (Dezembro de 2005 a Março de 2006).

A inibição de abrolhamento pela carvona foi explicada através do mecanismo de inibição reversível da actividade da enzima 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A redutase (HMGR), responsável pela síntese de metabolitos essenciais das plantas <sup>[1]</sup>. Embora a carvona iniba consideravelmente o abrolhamento, a sua utilização poderá apresentar algumas desvantagens, quer devido ao modo de aplicação, quer devido à sua rápida volatilização. Contudo estas desvantagens podem ser ultrapassadas com a introdução do composto de inclusão, um produto natural baseado em ciclodextrinas, conhecidas pelas suas propriedades e diversas aplicações, nomeadamente na indústria alimentar. De facto, o composto de inclusão, por um lado, possibilita a libertação controlada da carvona, por outro lado, por se apresentar sob a forma de pó, é de fácil aplicação e permite a diminuição da humidade nos tubérculos, prevenindo o aparecimento das podridões em armazém.

Poderá ainda acrescentar-se que, apesar dos custos da aplicação do composto de inclusão ainda ser consideravelmente superior à do CIPC (como seria de esperar uma vez que é o antiabrolhante convencional), o seu custo é 1,7 vezes inferior, comparativamente à aplicação da carvona.



**Figura 3** – Comprimento médio dos rebentos (cm) observados nos tubérculos de cada tratamento e na testemunha durante o período do ensaio, à escala industrial (Dezembro de 2005 a Março de 2006).

A avaliação das propriedades organolépticas da batata (e armazenada nas condições anteriormente mencionadas) processada através da fritura na Sociedade Industrial de Aperitivos (SIA) está a ser realizada através de ensaios de análise sensorial. O painel de provadores, treinado na ESAC, encontra-se a realizar provas triangulares, de modo a confirmar a ausência de diferenças organolépticas no produto final.

#### Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio do *Programa AGRO*, Acção 8.1 – Desenvolvimento Experimental e Demonstração (DE&D).

#### Referências

- [1] – Oosterhaven, J., Different aspects of S-Carvone, *A natural potato sprout inhibitor*, WAU dissertation n°1988, Wageningen, (1995)
- [3] – Jornal Oficial das Comunidades Europeias (JOCE), (2002), Decisão da Comissão de 14/08/02.
- [4] – Brown, P., Gracie, A., Morris, S., Laurence, R., Beattie, B., Yang, S. Vegetable and Potato ARAC, Research, Development and Extension Day 2002 Proceedings, (2002), 9
- [5] – Projecto FAIR CT 5-PL97-3355: [www.slugcontrol.iacr.ac.uk/](http://www.slugcontrol.iacr.ac.uk/)
- [6] – Sorce, C., Lorenzi, R., Ranalle, P., "The effects of S-(+)-Carvone treatments on seed potato tuber dormancy and sprouting". *Potato Res.*, 40, (1997) 155.
- [7] – INAG, A seca em Portugal - Relatório quinzenal, consultado em [www.confagri.pt](http://www.confagri.pt), a 3 de Janeiro de 2007.
- [8] – Moreira da Silva, A., Empis, J., Teixeira-Dias, J., "Preferencial inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin of one of the enantiomers of carvone: a 1H-NMR study in aqueous solution", *J. Inclusion Phenom. Mol. Re.*, 33, (1999), 81.
- [9] – Moreira da Silva, A., Empis, J., Teixeira-Dias, J., "Inclusion of carvone enantiomers in  $\beta$ -cyclodextrin: thermal behaviour and H/D, D/H exchanges", *J. Carb. Research*, 337, (2002) 2501.
- [10] – T. Baysal a, D.A.J. Starmans, *Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed*, *Journal of Supercritical Fluids* 14, (1999) 225
- [11] – H. Bouwmeester, J. Davies; H. Toxopeus, *Enantiomeric Composition of Carvone, Limonene, and Carveols in Seeds of Dill and Annual and Biennial Caraway Varieties*, *J. Agric. Food Chem.*, 43(12), (1995) 3057.

# APLICAÇÃO DE UMA LÍNGUA ELECTRÓNICA NA CLASSIFICAÇÃO DE MÉIS MONOFLORAIS

<sup>a</sup>Morais, L., <sup>\*a</sup>Dias, L. A., <sup>ab</sup>Peres, A. M., <sup>a</sup>Rocha, A., <sup>a</sup>Estevinho, L., <sup>c</sup>Machado, A. A. S. C.  
<sup>a</sup>CIMO; <sup>b</sup>LSRE - Escola Superior Agrária de Bragança – Instituto Politécnico de Bragança  
<sup>c</sup>LAQUIPAI, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto  
Tel +351-273 303 318 Fax +351-273 325 405 e-mail: ldias@ipb.pt

**Palavras-chave:** mel, pólen, língua electrónica, análise multivariada

**Resumo:** Analisou-se o perfil polínico de 51 amostras de mel nacional. Os pólenes mais frequentes no mel são originários das plantas dos géneros *Lavandula*, *Cistus*, *Echium*, *Erica*, *Castanea*, *Thymus*, *Prunus*, *Cytisus*, *Carduus*, *Trifolium* e *Citrus*. Considerando a classificação de mel monofloral de *Lavandula* (pólen predominante superior a 15%), de *Erica* e de *Echium* (pólen predominante superior a 45%) seleccionaram-se 38 méis monoflorais: 18, 9 e 11 destes méis foram classificados como méis monoflorais de *Lavandula*, *Erica* e *Echium*, respectivamente. Contudo há méis que podem ser classificados como mel monofloral de dois géneros de pólen (*Lavandula-Echium*, *Erica-Lavandula*, *Echium-Lavandula*). Os méis monoflorais foram analisados com um sistema de multi-sensores químicos não específicos de sensibilidade cruzada (Língua Electrónica) e os resultados foram tratados através da análise de componentes principais e análise discriminante. Verificou-se que é possível discriminar razoavelmente o mel monofloral de acordo com o género do pólen predominante.

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural de origem animal cujas características dependem da sua origem floral, a qual varia de região para região em consonância com a flora existente, dando-lhe características específicas que permitem a sua tipificação pela origem ou tipo, traduzindo-se em parâmetros de qualidade que beneficiam o produto, valorizando-o comercialmente. O mel designa-se de monofloral quando o néctar é predominantemente de uma única espécie vegetal, podendo ocorrer misturas com o néctar proveniente de flora secundária. A caracterização do mel monofloral é efectuada através da análise polínica ao mel, baseia-se na identificação morfológica e quantificação dos grãos de pólen, e corresponde ao conhecimento das plantas nectaríferas utilizadas pelas abelhas na produção do mel. A predominância de um néctar permite atribuir características organolépticas únicas ao mel quer ao nível do sabor quer ao nível do aroma reflectindo directamente na comercialização do mel [1]. As análises polínicas são de grande importância no controlo de qualidade alimentar do mel pois, além de permitirem definir a sua origem geográfica e botânica também permitem detectar adulterações.

Em geral aceita-se que o mel é monofloral se o seu perfil polínico apresentar uma predominância superior a 45% de um só pólen [2,3]. Contudo alguns méis podem ser considerados monoflorais com a presença de somente 15% de um pólen como, por exemplo, o mel de *Lavandula* ou, no caso de mel monofloral de castanheiro e eucalipto, o nível de frequência relativa do respectivo pólen deve ser superior a 70% [2,4]. Convém referir que as percentagens indicadas são valores indicativos e normalmente aceites pela comunidade apícola.

A avaliação de algumas propriedades organolépticas pode ser realizada recorrendo a sistemas de multi-sensores químicos (língua electrónica) de especificidade parcial aos diferentes componentes existentes numa solução, sendo um método apropriado de reconhecimento (identificação, classificação e discriminação), análise quantitativa de multi-componentes e avaliação do gosto ou sabor de vários líquidos [5].

Neste trabalho construiu-se um sistema de multi-sensores, contendo 20 sensores não específicos de sensibilidade cruzada, que produz sinais não específicos para diferentes componentes não particulares das amostras. O perfil de sinais gerado está relacionado com determinadas características ou qualidades da amostra. Os perfis de sinais obtidos podem ser avaliados recorrendo a métodos estatísticos multivariados para processamento do sinal, como por exemplo, análise de componentes principais (PCA), regressão pelos mínimos quadrados parciais (PLS), análise discriminante, entre outros [5].

Com este trabalho pretendeu-se verificar se o sistema de multi-sensores construído permite distinguir diferentes tipos de méis monoflorais tendo em conta o pólen predominante.

## **2. AMOSTRAGEM**

Neste estudo usaram-se 51 méis fornecidos pelas Associações de Apicultores de várias zonas de Portugal constituindo uma pequena amostragem mas, representativa do mel nacional. As amostras foram recolhidas e analisadas pelo sistema de multi-sensores após a análise polínica.

## **3. ANÁLISE POLÍNICA**

As análises polínicas foram efectuadas no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

As amostras de mel foram preparadas por diluição de 10,0 g de mel em 30,0 mL de água destilada e tratadas de acordo com o método acetolítico de Erdtman [7]. A análise polínica foi efectuada usando um microscópio óptico (marca Leica DMLB, com a objectiva 40×). Na identificação dos grãos de pólen recorreu-se a preparações de referência. Os pólenes foram identificados de acordo com a sua morfologia e classificados em grupos de plantas do mesmo género.

## **4. ANÁLISE COM SISTEMA DE MULTI-SENSORES**

As medições foram efectuadas com um sistema de multi-sensores e um eléctrodo de referência de Ag/AgCl de dupla junção (solução externa de  $K_2SO_4$  0,5M) acoplados a um “multiplexer Agilent Data Acquisition/Switch Unit modelo 34970A”. Cada canal do “multiplexer” (vinte canais) media “DC voltage” na escala de  $\pm 1$  V, com a opção de alta impedância. A aquisição dos dados foi efectuada com o software Agilent BenchLink Data Logger controlado por um computador PC através de uma porta de série RS-232 de 25 pinos. Os dados obtidos foram importados para o programa Excel que permitiu analisar e visualizar os resultados.

As experiências foram efectuadas a 25°C numa cuba de vidro de parede dupla, termostatzada usando um banho com cabeça termostática de marca Selecta Tectron Bio.

O sistema de multi-sensores foi construído num corpo de acrílico usando como contacto uma resina epoxilica de Ag com a referência EPO-TEK E4110. Cada membrana polimérica aplicada no sistema de multi-sensores foi preparada com a proporção de 5% do sensor, 65% de o-NPOE e 30% de PVC. Cada membrana foi dissolvida com pequenos volumes de tetrahidrofurano obtendo-se uma solução viscosa. Os sensores foram aplicados no corpo de acrílico por adição de gotas de cada mistura em cada um dos poços preparados (só se adicionava nova gota da mistura após a evaporação completa do solvente tetrahidrofurano), até o preenchimento do referido poço.

Os sensores usados na preparação das membranas estão referidas na Tabela 1 [5].

Tabela 1 – Sensores usados na língua electrónica

| Sensor | Sensor                                   |
|--------|--|
| S1     | 1-octadecanol                            |
| S2     | oleylalcohol                             |
| S3     | 1-tetradecanol                           |
| S4     | 1-dodecanol                              |
| S5     | octadecylamine                           |
| S6     | oleylamine                               |
| S7     | Dodecylamine                             |
| S8     | Octylamine                               |
| S9     | 1-dodecanethiol                          |
| S10    | 1-octadecanethiol                        |
| S11    | potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate |
| S12    | trioctylmethylammonium chloride (TOMA)   |
| S13    | Tridodecylmethylammonium chloride (TDMA) |
| S14    | DOP + TOMA                               |
| S15    | DOP + TDMA                               |
| S16    | Diocetylphenylphosphate (DOP)            |
| S17    | Undecanoic acid                          |
| S18    | Dodecanoic acid                          |
| S19    | Octadecanoic acid                        |
| S20    | Oleic acid                               |

As amostras foram preparadas por medição de aproximadamente 8 g de mel e diluídas com água desionizada até se obter a concentração de 0,2% m/m em mel.

## 5. RESULTADOS

A análise polínica efectuada permitiu concluir que, em geral, os méis estudados apresentavam uma composição polínica com uma diversidade superior a 3 géneros de pólen excepto para 9 méis; 6 méis continham apenas 3 géneros de pólen e 3 méis apenas com dois géneros de pólen. Globalmente, as percentagens totais dos 3 géneros de pólen predominantes, em cada mel analisado, variaram entre 63 e 100%.

Os méis analisados apresentam uma composição polínica associada aos géneros de plantas *Lavandula*, *Cistus*, *Echium*, *Erica*, *Castanea*, *Thymus*, *Prunus*, *Cytisus*, *Carduus*, *Trifolium*, *Citrus* e outros (por ordem decrescente da frequência de ocorrência nos méis).

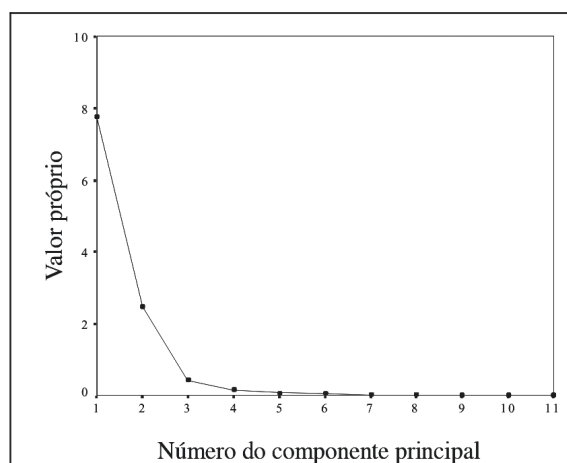
Os pólenes do género *Lavandula* estão presentes em 20 méis como pólen predominante e em 5 méis como pólen secundário, estando presentes em 85% dos méis. O segundo género de pólen mais frequente no mel é do género *Cistus* (presente em 77% dos méis embora não seja um pólen nectarífero) sendo o pólen secundário em 13 méis e o pólen pouco frequente em 14 méis. Os pólenes do género *Echium* estão presentes em 67% dos méis, sendo o predominante em 20 méis e o pólen secundário em 21 méis. O quarto pólen mais frequente nos méis estudados pertence ao género *Erica* (presente em 31% dos méis), sendo o pólen predominante em 11 méis e o pólen secundário em 3 méis. O pólen do género *Castanea* é o quinto pólen mais frequente no mel (presente em 30% dos méis). Os restantes tipos de pólen do perfil polínico acima referido estão presentes como pólenes secundários ou simplesmente são pólenes pouco frequentes.

Dos 51 méis analisados só 33 méis apresentam frequências relativas do pólen predominante superiores a 45%. Dos restantes méis, 13 têm percentagens do pólen predominante entre 35 e 45% e 5 méis entre 24 e 35%. Considerando a classificação de mel monofloral de *Lavandula* (pólen predominante superior a 15%), de *Erica* e de *Echium* (pólen predominante superior a 45%) seleccionaram-se 38 méis monoflorais: 18, 9 e 11 destes méis foram classificados como méis monoflorais de *Lavandula*, *Erica* e *Echium*, respectivamente. É de referir que nos primeiros méis monoflorais, 4 podem ser também classificados como sendo méis monoflorais de *Echium*. Dos segundos méis monoflorais, 2 podem ser igualmente classificados como méis monoflorais de *Lavandula*. Dos últimos, 9 méis podem ser classificados como méis monoflorais de *Lavandula*.

Os resultados obtidos para cada mel com o sistema de multi-sensores foram avaliados por análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante (AD).

Usou-se o método da análise de componentes principais com objectivo de reduzir o número de dados através da identificação de novas variáveis, em menor número que o conjunto inicial, sem perder informação relevante [8,9].

A Figura 1 apresenta o scree-plot obtido. Pela análise do scree-plot e tendo em conta a percentagem de variância total explicada retiveram-se os três primeiros componentes principais, que explicam 93% da variância total. Uma quarta dimensão não foi considerada uma vez que conduzia a um valor próprio inferior a 1, correspondendo a um valor negativo do parâmetro  $\alpha$ -Cronbach.

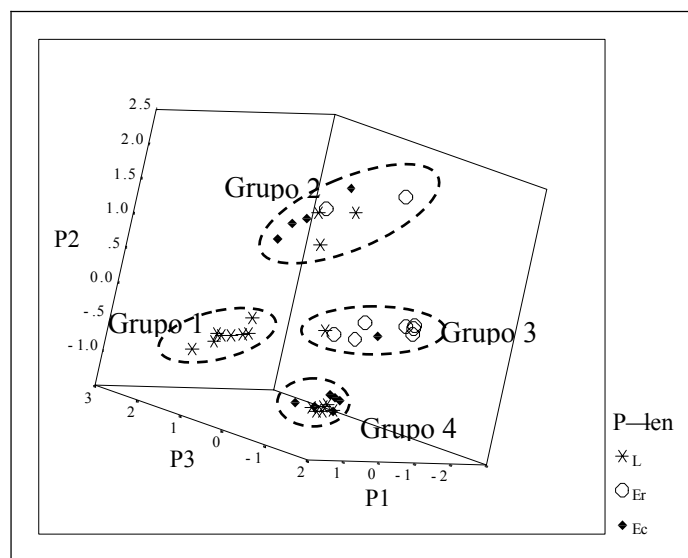


**Figura 1** – Representação Scree-plot da análise de componentes principais

Na Figura 2 mostra-se a representação gráfica 3D dos três componentes principais seleccionados para as 38 amostras de mel monofloral seleccionadas.

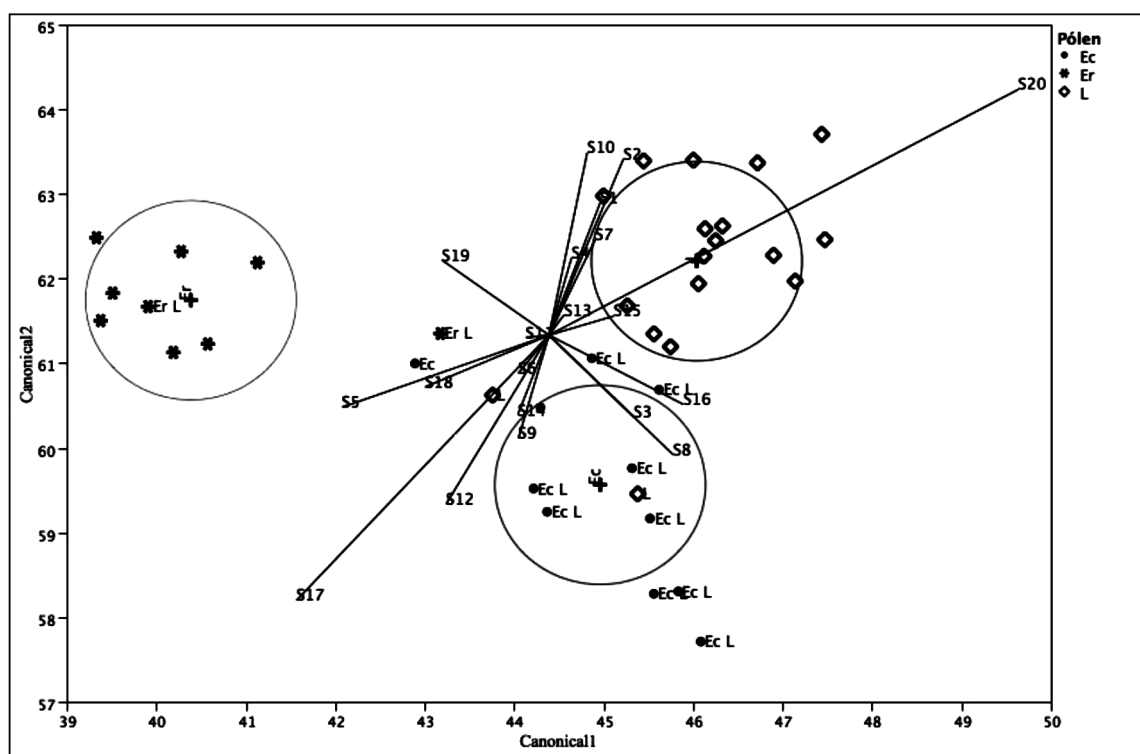
A projecção dos resultados das amostras de mel segundo os 3 componentes principais mostra a existência de 4 grupos: o grupo 1 contém méis monoflorais de *Lavandula*, o grupo 2 é um grupo misto dos três géneros de pólen, o grupo 3 inclui essencialmente méis monoflorais de *Erica* e o grupo 4 contém principalmente méis monoflorais de *Echium*. Nenhum dos grupos contém uma classe individual totalmente separada de um género de pólen. Estes resultados podem estar associados à composição multifloral dos méis analisados, pois o pólen secundário pertence, em geral, a uma das famílias de pólen que se pretende discriminar.

Finalmente, aplicou-se a análise discriminante com o objectivo de diferenciar e classificar os méis monoflorais em três grupos de acordo com os géneros de pólen *Lavandula*, *Erica* e *Echium*.



**Figura 2** – Representação 3D dos componentes principais para as 38 amostras de mel monofloral *L-Lavandula*; *Er-Erica*; *Ec-Echium*

A análise realizada permitiu obter 2 funções discriminantes que possibilitam previsões aceitáveis. Os méis foram classificados correctamente em 87% dos casos considerando o conjunto original de amostras e em 58%, efectuando validação cruzada para averiguar a capacidade de previsão. Verifica-se que na validação cruzada os méis monoflorais classificados correctamente são: 65% dos méis monoflorais de *Lavandula*, 80% dos méis monoflorais de *Erica* e 33% dos méis monoflorais de *Echium*.



**Figura 3** – Representação da primeira e segunda função discriminante para as 38 amostras de mel Monofloral. *L-Lavandula*; *Er-Erica*; *Ec-Echium*

Na Figura 3 mostra-se a representação gráfica das duas funções discriminantes aplicada às 38 amostras de mel analisadas, baseada nos sinais obtidos pelo sistema de multi-sensores.

A análise da Figura 3 mostra a separação dos méis monoflorais de *Erica* em relação aos méis monoflorais de *Lavandula* e *Echium*. Para os méis monoflorais de *Echium*, a sua proximidade aos méis monoflorais de *Lavandula* deve-se provavelmente à presença de *Lavandula* nestes méis. Na Figura 3 evidenciam-se os méis monoflorais de *Echium* e de *Erica* com presença de pólen de *Lavandula* em percentagem suficiente para serem considerados méis monoflorais de *Lavandula*.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo realizado indica que é possível diferenciar razoavelmente o mel monofloral de acordo com o género de pólen predominante. Contudo verificou-se ser possível uma segunda classificação para alguns dos méis analisados, ou seja, um mesmo mel pode ser classificado como mel monofloral de dois géneros de pólen (*Lavandula-Echium*, *Erica-Lavandula*, *Echium-Lavandula*). Este facto dificulta a discriminação entre os três tipos de méis monoflorais. Neste momento decorrem trabalhos adicionais no sentido de aumentar o número de amostras de mel monofloral cuja abundância do pólen predominante seja superior a 80%.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] – L. P. Oddo, S. Bogdanov, *Determination of honey botanical origin: problems and issues*, *Apidologie* **35** (2004) S2–S3
- [2] – M. C. Seijo, M. J. Aira, J. Méndez, *Palynological differences in the pollen content of Eucalyptus honey from Australia, Portugal and Spain*, *Grana* **42** (2003), N°3, 183-190
- [3] – A.C. Andrada, M.C. Tellería, *Botanical origin of honey from south of Calde'n district (Argentina)*, *Grana* **41** (2002), N°1, 58-62
- [4] – M. Maia, P. A. Russo-Almeida e J. O. Pereira, *Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal)*, *Silva Lusitana* **13** (2005), N°1, p.95-103
- [5] – K. Toko, *Biomimetic Sensor Technology*, Cambridge University Press (2000)
- [6] – K. Toko, *A taste sensor*, *Meas. Sci. Technol.* **9** (1998), N°12, 1919-1936
- [7] – G. Erdtmand, *The Acetolysis Method: a Revised Description*, *Svensk Bot. Tidskr.* **54** (1960), 561-564
- [8] – E. Reis, *Estatística Multivariada Aplicada*, Ed. Sílabo (2001)
- [9] – J. Maroco, *Análise Estatística com Utilização do SPSS*, Ed. Sílabo (2003)

### Nota:

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto FCT nº POCI/QUI/58076/2004 com o título “Línguas electrónicas e bioelectrónicas (línguas-BE) para sensorização ambiental e alimentar”.



# ESTABELECIMENTO DO PERFIL VOLÁTIL DA MAÇÃ ‘BRAVO DE ESMOLFE’ POR SPME-GC-QMS

*Reis, S.F.A.R. \*; Rocha, S.M.; Barros, A.S.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A.*

Departamento de Química, Universidade de Aveiro

3810-193 Aveiro

Tel. +351-234 401 508 Fax +351-234 370 084 e-mail: [sreis@dq.ua.pt](mailto:sreis@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** maçã ‘Bravo de Esmolfe’, microextração em fase sólida, composição volátil, colheita, armazenamento.

**Resumo:** O aroma é um factor determinante na identificação varietal e determinação da qualidade das maçãs. A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ é uma variedade autóctone de Portugal à qual é atribuído um aroma muito apreciado pelo consumidor. O presente estudo tem como objectivo estabelecer o perfil volátil característico das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. Assim, a composição volátil desta variedade de maçã foi analisada com recurso à metodologia de microextração em fase sólida seguida de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com detecção por quadupolo (SPME-GC-qMS). Foram usadas maçãs provenientes de dois porta-enxertos diferentes (PAJAM2 e MM106) que foram analisadas logo após a colheita e após armazenamento a 4°C, durante 2, 3 e 4 meses.

O perfil volátil encontrado é constituído por um composto maioritário, o *E,E*- $\alpha$ -farneseno, por uma numerosa família de ésteres e por alguns compostos das famílias dos álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos aromáticos, fenóis e compostos terpénicos. Verifica-se que o porta-enxerto, a disposição da árvore no pomar e a disposição do fruto na árvore não influenciam significativamente a composição volátil das maçãs. A análise por componentes principais permite distinguir maçãs após a colheita e maçãs armazenadas quatro meses a 4°C. As primeiras estão relacionadas com compostos da família dos aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos e fenóis e as segundas estão relacionadas com compostos da família dos álcoois, dos compostos terpénicos e a maioria dos ésteres.

Sugere-se que alguns compostos, identificados pela primeira vez na composição volátil de maçãs, possam estar relacionados com o aroma varietal das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’. São eles: o ocimeno, o cimeno, o *trans*- $\alpha$ -bergamoteno, a geranil acetona, o nerolidol, o farnesol e o 3-metiltio-propanoato de etilo. Estes compostos apresentam descritores de aroma cítricos e florais.

## 1. INTRODUÇÃO

A maçã ‘Bravo de Esmolfe’ (BE) é uma maçã regional cada vez mais apreciada pelo consumidor devido às suas características organolépticas, em especial o seu aroma. Assim, o estudo da sua composição volátil torna-se de grande importância na sua caracterização e determinação da qualidade.

Recentemente foi realizado um estudo sobre a composição volátil de maçãs BE [1]. Estudos realizados sobre a composição volátil de outras variedades de maçã permitiram identificar cerca de 300 compostos voláteis, destes apenas um número muito reduzido parece contribuir para o aroma [2,3,4]. A composição volátil do fruto depende de vários factores como por exemplo da metodologia utilizada para a sua extração e análise [2,3,4], da variedade, das práticas de cultivo, das condições climatéricas, da data de colheita do fruto e do seu estado de maturação [4,5]. No entanto, verifica-se que mesmo considerando a influência de todos estes factores, os ésteres são a família maioritária da composição volátil da maçã seguida dos álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, éteres, hidrocarbonetos, terpenóides, norisoprenóides e lactonas [2,3,4,5].

Nos últimos anos têm sido muito utilizadas metodologias que permitem o estudo dos compostos voláteis presentes na fase de vapor envolvente de um produto (espaço de cabeça), os quais são percebidos pelo sistema olfativo [6], sendo potencialmente responsáveis pelo aroma. Dentro destas metodologias está incluída a microextração em fase sólida (SPME) em modo de espaço de cabeça, acoplada a um sistema cromatográfico, já usada na análise da composição volátil de maçãs [7,8,9].

Este trabalho tem como objectivo estabelecer o perfil volátil da maçã BE a partir da análise da composição volátil por SPME-GC-qMS de frutos provenientes de dois porta-enxertos, duas árvores por porta-enxerto e de dois quadrantes por árvore após a colheita e ao longo do armazenamento a 4°C.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Amostras.** Foram usadas maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ colhidas na Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral (DRABL) a 25 de Setembro de 2003. As maçãs foram colhidas em dois porta-enxertos distintos (PAJAM2 e MM106). Em cada porta-enxerto foram colhidas maçãs de duas árvores seleccionadas aleatoriamente e em cada árvore a colheita foi realizada em dois quadrantes, Norte e Sul. As maçãs foram armazenadas a 4°C até ao dia da análise. As análises da composição volátil foram realizadas nos meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2003 e Janeiro de 2004.

**2.2. SPME-GC-qMS.** Duas maçãs (*ca.* 300 g) foram colocadas num frasco de 1,1 L o qual permaneceu fechado durante duas horas e meia. Ao fim deste período foi introduzida a seringa de SPME, com o revestimento carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB) 65 µm de espessura, no espaço de cabeça do frasco, a qual permaneceu no frasco durante 30 min. Todo este processo decorreu a uma temperatura constante de  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , por imersão completa do frasco com a amostra num banho termostaticado. De seguida procedeu-se à separação e identificação dos compostos sorvidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com detecção por quadrupolo (GC-qMS), de acordo com Rocha *et al.*, 2000 [10].

**2.3. Tratamento de dados.** Às áreas normalizadas dos 108 compostos identificados por GC-qMS (amostras provenientes de dois porta-enxertos, com duas árvores por porta-enxerto, dos quadrantes norte e sul de cada árvore, num total de 8 amostras, cada uma com 1 a 5 réplicas) foi aplicado um teste de *t* emparelhado a uma distribuição normal com 95% de confiança e foi efectuada uma análise por componentes principais (PCA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Composição volátil da maçã ‘Bravo de Esmolfe’

Aos dados obtidos em cada fase de análise (Outubro, Novembro, Dezembro e Janeiro) foi aplicado um teste de *t* emparelhado para verificar se existia ou não uma diferença estatisticamente significativa entre frutos provenientes de diferentes quadrantes, árvores e porta-enxertos. Verificou-se que não há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre quadrantes, entre árvores e entre porta-enxertos. Assim, o porta-enxerto, a árvore e a posição do fruto na árvore não têm efeitos estatisticamente significativos na composição volátil destas maçãs. Este efeito foi observado para todas as fases de análise. Na sequência destes resultados, os dados apresentados na Tabela 1 correspondem à média de todas as réplicas em cada fase de análise.

**Tabela 1-** Compostos voláteis e semi-voláteis identificados na maçã BE por SPME-GC-qMS, ao longo de 4 meses de armazenamento a 4°C.

| n°<br>pic<br>o              | Composto                                  | Ident.ª | Área cromatográfica x 10 <sup>-7</sup> |           |               |           |               |           |               |           |
|-----------------------------|---|---------|--|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|                             |   |         | Outubro                                |           | Novembro      |           | Dezembro      |           | Janeiro       |           |
|                             |   |         | n = 39                                 | CV        | n = 32        | CV        | n = 30        | CV        | n = 15        | CV        |
| <b>Ésteres</b>              |   |         |  |           |               |           |               |           |               |           |
| 1                           | Acetato de etilo                          | B, C    | 0,23                                   | 158       | 0,51          | 93        | 0,93          | 92        | 2,28          | 53        |
| 3                           | Propanoato de etilo                       | B, C    | 0,25                                   | 257       | 0,31          | 109       | 0,58          | 82        | 1,47          | 55        |
| 4                           | 2-Metil-propanoato de etilo               | B, C    | 0,05                                   | 169       | 0,08          | 89        | 0,12          | 77        | 0,39          | 60        |
| 5                           | Acetato de propilo                        | B, C    | 0,05                                   | 129       | 0,05          | 62        | 0,06          | 69        | 0,10          | 58        |
| 6                           | Butanoato de metilo                       | B, C    | 0,04                                   | 78        | 0,15          | 66        | 0,40          | 64        | 0,90          | 59        |
| 7                           | 2-Metil-butanoato de metilo               | B, C    | 0,07                                   | 74        | 0,10          | 97        | 0,20          | 102       | 0,38          | 64        |
| 8                           | Acetato de 2-metil-propilo                | B, C    | 0,03                                   | 88        | 0,06          | 77        | 0,07          | 63        | 0,11          | 51        |
| 9                           | Butanoato de etilo                        | B, C    | 2,28                                   | 102       | 7,82          | 53        | 9,72          | 70        | 27,77         | 22        |
| 10                          | Propanoato de propilo                     | B, C    | 0,11                                   | 128       | 0,12          | 32        | 3,29          | 147       | —             | —         |
| 11                          | 2-Metil-butanoato de etilo                | B, C    | 1,16                                   | 224       | 3,64          | 102       | 4,79          | 78        | 10,47         | 58        |
| 12                          | Acetato de butilo                         | B, C    | 0,58                                   | 72        | 1,55          | 44        | 1,96          | 53        | 2,46          | 35        |
| 14                          | Acetato de 2-metil-butilo                 | B, C    | 0,88                                   | 97        | 2,06          | 79        | 3,23          | 76        | 4,78          | 48        |
| 16                          | Pentanoato de etilo                       | B, C    | 0,06                                   | 32        | 0,12          | 54        | 0,21          | 58        | 0,59          | 46        |
| 17                          | 2-Metil-butanoato de propilo              | B, C    | 0,10                                   | 149       | 0,15          | 68        | 0,18          | 76        | 0,61          | 55        |
| 18                          | Propanoato de butilo                      | B, C    | 0,04                                   | 59        | 0,10          | 70        | 0,13          | 77        | 0,13          | 42        |
| 19                          | 2-Metil-propanoato de 2-metil-propilo     | B, C    | 0,01                                   | 36        | 0,02          | 43        | 0,03          | 60        | 0,07          | 74        |
| 20                          | Butanoato de 2-metil-propilo              | B, C    | 0,02                                   | 22        | 0,02          | 46        | 0,04          | 69        | 0,09          | 46        |
| 21                          | E-2-Butenoato de etilo                    | B, C    | 0,03                                   | 105       | 0,08          | 71        | 0,12          | 68        | 0,37          | 50        |
| 22                          | Acetato de pentilo                        | B, C    | 0,12                                   | 42        | 0,23          | 27        | 0,36          | 32        | 0,76          | 32        |
| 25                          | Hexanoato de metilo                       | B, C    | 0,06                                   | 72        | 0,28          | 89        | 0,93          | 63        | 2,28          | 57        |
| 27                          | Butanoato de butilo                       | B, C    | 1,67                                   | 50        | 2,50          | 50        | 2,64          | 52        | 2,94          | 47        |
| 28                          | 2-Metil-butanoato de butilo               | B, C    | 0,74                                   | 113       | 1,12          | 63        | 0,83          | 60        | 0,79          | 46        |
| 29                          | Hexanoato de etilo                        | A, B, C | 3,29                                   | 220       | 14,70         | 65        | 22,29         | 67        | 62,84         | 29        |
| 31                          | 2-Metil-2-butenato de etilo               | B, C    | 1,27                                   | 184       | 0,20          | 67        | 0,44          | 51        | 0,95          | 35        |
| 34                          | Butanoato de 2-metil-butilo               | B, C    | 0,13                                   | 63        | 0,14          | 67        | 0,21          | 74        | 0,29          | 46        |
| 36                          | Acetato de hexilo                         | A, B, C | 6,14                                   | 76        | 12,75         | 20        | 15,07         | 27        | 27,07         | 23        |
| 38                          | Hexenoato de etilo                        | B, C    | 0,04                                   | 158       | 0,04          | 72        | 0,07          | 61        | 0,29          | 44        |
| 39                          | Hexenoato de etilo (isômero)              | B, C    | 0,02                                   | 93        | 0,03          | 66        | 0,05          | 71        | 0,13          | 40        |
| 40                          | Pentanoato de butilo                      | B, C    | 0,03                                   | 58        | 0,06          | 39        | 0,07          | 37        | 0,09          | 22        |
| 41                          | Butanoato de pentilo                      | B, C    | 0,22                                   | 38        | 0,24          | 51        | 0,26          | 52        | 0,35          | 33        |
| 42                          | Hexanoato de propilo                      | B, C    | 0,54                                   | 155       | 1,68          | 49        | 2,16          | 51        | 4,18          | 35        |
| 43                          | Acetato de hexenilo                       | B, C    | 0,04                                   | 41        | —             | —         | —             | —         | —             | —         |
| 44                          | 2-Metil-butanoato de pentilo              | B, C    | 0,15                                   | 104       | 0,20          | 49        | 0,19          | 79        | 0,26          | 36        |
| 45                          | Heptanoato de etilo                       | A, B, C | 0,16                                   | 218       | 0,28          | 84        | 0,45          | 64        | 1,40          | 38        |
| 46                          | Propanoato de hexilo                      | B, C    | 0,20                                   | 110       | 0,49          | 57        | 1,11          | 39        | 1,07          | 37        |
| 47                          | 2-Metil-propanoato de hexilo              | B, C    | vt                                     | —         | vt            | —         | vt            | —         | vt            | —         |
| 49                          | E-2-Hexenoato de etilo                    | B, C    | 0,06                                   | 99        | 0,09          | 74        | 0,15          | 55        | 0,39          | 30        |
| 51                          | Hexanoato de 2-metil-propilo              | B, C    | 0,08                                   | 41        | 0,13          | 40        | 0,19          | 40        | 0,42          | 29        |
| 53                          | Acetato de heptilo                        | B, C    | 0,05                                   | 83        | 0,08          | 31        | 0,08          | 43        | 0,20          | 29        |
| 54                          | E-4-Heptenoato de etilo                   | B, C    | 0,02                                   | —         | 0,02          | 27        | 0,03          | 35        | 0,06          | 21        |
| 55                          | Octanoato de metilo                       | B, C    | vt                                     | —         | 0,09          | 45        | 0,20          | 58        | 0,51          | 56        |
| 57                          | Hexanoato de butilo                       | B, C    | 8,41                                   | 69        | 17,28         | 38        | 19,43         | 39        | 25,79         | 37        |
| 58                          | Butanoato de hexilo                       | B, C    | 4,05                                   | 66        | 10,04         | 36        | 12,36         | 36        | 21,42         | 46        |
| 59                          | 2-Metil-2-butenato de butilo              | B, C    | —                                      | —         | —             | —         | —             | —         | —             | —         |
| 60                          | 2-Metil-butanoato de hexilo               | B, C    | 5,00                                   | 131       | 14,12         | 54        | 13,47         | 42        | 24,38         | 29        |
| 61                          | Octanoato de etilo                        | A, B, C | 1,69                                   | 168       | 6,04          | 66        | 6,97          | 56        | 20,43         | 31        |
| 62                          | Butanoato de 3-hexenilo                   | B, C    | —                                      | —         | 0,02          | 30        | —             | —         | —             | —         |
| 63                          | Hexanoato 3-metil-butilo                  | B, C    | 0,40                                   | 103       | 0,66          | 61        | 0,95          | 50        | 1,93          | 35        |
| 64                          | Z-4-Octenoato de etilo                    | B, C    | 0,46                                   | 64        | 0,18          | 142       | 0,47          | 149       | 0,08          | 12        |
| 66                          | Acetato de octilo                         | B, C    | —                                      | —         | 0,17          | 43        | 0,19          | 51        | 0,35          | 25        |
| 68                          | 2,4-Hexadienoato de etilo                 | B, C    | 0,18                                   | 61        | 0,30          | 116       | 0,59          | 109       | 1,26          | 69        |
| 71                          | Hexanoato de pentilo                      | B, C    | 1,19                                   | 52        | 1,78          | 32        | 2,11          | 27        | 4,22          | 22        |
| 72                          | Octanoato de propilo                      | B, C    | 0,25                                   | 60        | 0,41          | 52        | 0,42          | 55        | 1,00          | 36        |
| 73                          | 3-Hidroxi-butanoato de etilo              | A, B, C | 0,22                                   | —         | 0,09          | 107       | 0,36          | 66        | 0,66          | 96        |
| 74                          | Nonanoato de etilo                        | B, C    | —                                      | —         | 0,08          | 51        | 0,07          | 63        | 0,31          | 22        |
| 75                          | E-2-Octenoato de etilo                    | B, C    | 0,08                                   | 51        | 0,33          | 109       | 0,50          | 74        | 1,64          | 41        |
| 76                          | 2-Butenoato de hexilo                     | B, C    | 0,03                                   | 27        | 0,12          | 31        | 0,16          | 41        | 0,34          | 48        |
| 78                          | 3-(Metilíto)-propanoato de etilo          | B, C    | 0,04                                   | 21        | 0,05          | 60        | 0,08          | 85        | 0,39          | 71        |
| 80/                         | Hexanoato de hexilo + Octanoato de butilo | B, C    | 11,24                                  | 87        | 22,64         | 36        | 26,22         | 31        | 49,49         | 39        |
| 81                          |   |         |  |           |               |           |               |           |               |           |
| 82                          | 2-Metil-2-butenato de hexilo              | B, C    | —                                      | —         | —             | —         | —             | —         | —             | —         |
| 83                          | 4-Decenoato de metilo                     | B, C    | 0,07                                   | —         | 0,07          | 58        | 0,15          | 54        | 0,38          | 42        |
| 84                          | Decanoato de etilo                        | B, C    | vt                                     | —         | 0,68          | 87        | 0,33          | 69        | 0,80          | 44        |
| 86                          | Hexanoato de Z-3-hexenilo                 | B, C    | 0,11                                   | 83        | —             | —         | 0,14          | 95        | —             | —         |
| 87                          | Benzoato de etilo                         | B, C    | 0,23                                   | 12        | 0,12          | 62        | 0,13          | 25        | 0,15          | 32        |
| 88                          | Octanoato de 2-metil-butilo               | B, C    | 0,16                                   | 104       | 0,19          | 51        | 0,28          | 47        | 0,35          | 35        |
| 90                          | E-4-Decenoato de etilo                    | B, C    | 0,45                                   | 122       | 0,94          | 72        | 1,06          | 69        | 2,53          | 46        |
| 92                          | Octanoato de pentilo                      | B, C    | 0,15                                   | 78        | 0,22          | 36        | 0,26          | 38        | 0,60          | 28        |
| 93                          | Acetato de benzilo                        | B, C    | 0,01                                   | 83        | 0,03          | 46        | 0,04          | 28        | 0,08          | 45        |
| 96                          | Octanoato de hexilo                       | B, C    | 0,30                                   | 109       | 0,56          | 40        | 0,49          | 39        | 0,80          | 45        |
| 98                          | Decanoato de butilo                       | B, C    | —                                      | —         | 0,04          | 35        | 0,03          | 13        | —             | —         |
| 99                          | E-2-Z-4-decadienoato de etilo             | B, C    | 0,11                                   | 98        | 0,45          | 114       | 0,52          | 81        | 1,31          | 46        |
| 100                         | Dodecanoato de etilo                      | B, C    | 0,12                                   | 66        | 0,17          | 90        | 0,15          | 73        | 0,35          | 45        |
| 104                         | 3-Hidroxi-octanoato de etilo              | B, C    | 0,07                                   | —         | 0,14          | 83        | 0,12          | 52        | 0,18          | 56        |
|                             | <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>     |         | <b>49,90</b>                           | <b>81</b> | <b>128,23</b> | <b>20</b> | <b>156,86</b> | <b>19</b> | <b>317,57</b> | <b>11</b> |
|                             | <b>Subtotal (%)</b>                       |         | <b>39,65</b>                           | <b>30</b> | <b>39,98</b>  | <b>15</b> | <b>49,59</b>  | <b>17</b> | <b>53,64</b>  | <b>16</b> |
| <b>Compostos terpênicos</b> |   |         |  |           |               |           |               |           |               |           |
| 23                          | Limoneno                                  | A, B, C | vt                                     | —         | vt            | —         | vt            | —         | vt            | —         |
| 32                          | Ocimeno                                   | B, C    | 0,05                                   | 86        | 0,05          | 27        | 0,04          | 86        | 0,09          | 36        |
| 50                          | Cimeno                                    | B, C    | vt                                     | —         | vt            | —         | vt            | —         | vt            | —         |
| 94                          | trans- $\alpha$ -Bergamoteno              | B, C    | 0,14                                   | 86        | 0,46          | 89        | 0,76          | 52        | 1,89          | 53        |
| 95                          | E,E- $\alpha$ -Farneseno                  | B, C    | 71,32                                  | 70        | 195,38        | 31        | 158,91        | 30        | 274,18        | 28        |
| 101                         | Geranyl acetona                           | B, C    | 0,07                                   | 57        | 0,15          | —         | 0,10          | 43        | —             | —         |
| 102                         | Nerolidol                                 | A, B, C | vt                                     | —         | 0,13          | 48        | 0,14          | 58        | 0,44          | 43        |
| 105                         | Farnesol                                  | B, C    | 0,03                                   | 42        | 0,13          | 46        | 0,13          | 53        | 0,46          | 33        |
| 107                         | Dendrolasina                              | B, C    | 0,11                                   | 64        | 0,56          | 81        | 0,58          | 60        | 1,18          | 71        |
|                             | <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>     |         | <b>71,52</b>                           | <b>70</b> | <b>196,57</b> | <b>31</b> | <b>160,50</b> | <b>30</b> | <b>278,10</b> | <b>28</b> |
|                             | <b>Subtotal (%)</b>                       |         | <b>57,29</b>                           | <b>22</b> | <b>59,25</b>  | <b>10</b> | <b>49,55</b>  | <b>18</b> | <b>45,49</b>  | <b>19</b> |

Tabela 1 (continuação)

| n°<br>pic<br>o | Composto   | Ident. <sup>a</sup> | Área cromatográfica x 10 <sup>-7</sup> |            |               |           |               |           |               |           |
|----------------|--|---------------------|--|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|                |  |                     | Outubro                                |            | Novembro      |           | Dezembro      |           | Janeiro       |           |
|                |  |                     | n = 39                                 | CV         | n = 32        | CV        | n = 30        | CV        | n = 15        | CV        |
| <b>Alcoois</b> |  |                     |  |            |               |           |               |           |               |           |
| 2              | Etanol   | A, B, C             | 0,18                                   | 123        | 0,35          | 85        | 0,55          | 95        | 1,13          | 72        |
| 24             | Butanol  | A, B, C             | 0,06                                   | 31         | 0,10          | 29        | 0,20          | 46        | 0,43          | 47        |
| 30             | 2-Metil-1-butanol                                | B, C                | 0,16                                   | 106        | 0,28          | 44        | 0,17          | 56        | 0,53          | —         |
| 52             | Hexanol  | A, B, C             | 0,52                                   | 80         | 0,83          | 20        | 0,98          | 34        | 1,66          | 19        |
| 65             | 6-Metil-5-hepteno-2-ol                           | B, C                | —                                      | —          | 0,16          | 100       | 0,26          | 41        | 0,74          | 37        |
| 70             | 2-Etil-1-hexanol                                 | B;C                 | 0,08                                   | 42         | 0,05          | 36        | —             | —         | 0,21          | 63        |
| 79             | Octanol  | A, B, C             | 0,04                                   | 92         | 0,07          | 43        | 0,09          | 38        | 0,24          | 36        |
|                | <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>            |                     | <b>0,80</b>                            | <b>75</b>  | <b>1,48</b>   | <b>28</b> | <b>2,08</b>   | <b>35</b> | <b>4,23</b>   | <b>17</b> |
|                | <b>Subtotal (%)</b>                              |                     | <b>0,68</b>                            | <b>33</b>  | <b>0,46</b>   | <b>24</b> | <b>0,65</b>   | <b>31</b> | <b>0,71</b>   | <b>19</b> |
| <b>Outros</b>  |  |                     |  |            |               |           |               |           |               |           |
| 13             | Etilbenzeno                                      | B;C                 | 0,01                                   | 39         | —             | —         | 0,02          | 31        | —             | —         |
| 15             | <i>p</i> -Xileno                                 | B;C                 | 0,04                                   | 42         | 0,03          | 43        | 0,03          | 35        | vt            | —         |
| 26             | <i>o</i> -Etil-tolueno                           | B, C                | 0,03                                   | 124        | 0,02          | 40        | 0,02          | 42        | —             | —         |
| 33             | Vinilbenzeno                                     | B;C                 | 0,04                                   | 34         | 0,04          | 65        | 0,04          | 37        | 0,07          | 28        |
| 35             | 1,3,5-Trimetilbenzeno                            | B, C                | 0,04                                   | 38         | 0,02          | 56        | 0,05          | 41        | 0,11          | 31        |
| 37             | Octanal  | B, C                | 0,05                                   | 49         | 0,01          | 41        | 0,05          | 39        | 0,06          | —         |
| 48             | 6-Metil-5-hepteno-2-ona                          | B, C                | 0,14                                   | 53         | vt            | —         | 0,30          | 23        | vt            | —         |
| 56             | Nonanal  | B;C                 | 0,15                                   | 60         | vt            | —         | 0,04          | 28        | —             | —         |
| 67             | Ácido acético                                    | A, B, C             | 1,75                                   | 115        | 0,33          | 55        | 0,19          | —         | —             | —         |
| 69             | Decanal  | B, C                | 0,12                                   | 66         | 0,07          | 65        | —             | —         | 0,25          | 44        |
| 77             | Ácido propanóico                                 | B, C                | 0,48                                   | 180        | 0,09          | 57        | 0,08          | 32        | 0,16          | —         |
| 85             | Ácido butanóico                                  | B, C                | 1,27                                   | 98         | 0,70          | 78        | 0,40          | 51        | 0,51          | 23        |
| 89             | Estragol   | B, C                | vt                                     | —          | vt            | —         | vt            | —         | vt            | —         |
| 91             | Ácido 2-metil-hexanóico                          | B, C                | 0,13                                   | 82         | 0,08          | 44        | 0,08          | 32        | 0,08          | 7         |
| 97             | Anisol   | B, C                | 0,07                                   | 43         | —             | —         | —             | —         | —             | —         |
| 103            | Ácido hexanóico                                  | A, B, C             | 0,04                                   | 71         | 0,18          | 70        | —             | —         | 0,15          | 21        |
| 106            | 2,6- <i>bis</i> -(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol | B, C                | 0,59                                   | 29         | 0,36          | 45        | 0,23          | 46        | 0,27          | 46        |
| 108            | 2,4,6- <i>Tri-sec</i> -butilfenol                | B, C                | 0,11                                   | 46         | —             | —         | 0,18          | —         | —             | —         |
|                | <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>            |                     | <b>2,17</b>                            | <b>105</b> | <b>0,96</b>   | <b>66</b> | <b>0,66</b>   | <b>46</b> | <b>0,92</b>   | <b>28</b> |
|                | <b>Subtotal (%)</b>                              |                     | <b>2,40</b>                            | <b>81</b>  | <b>0,30</b>   | <b>68</b> | <b>0,21</b>   | <b>44</b> | <b>0,16</b>   | <b>31</b> |
|                | <b>Total</b>                                     |                     | <b>124,40</b>                          | <b>67</b>  | <b>327,25</b> | <b>24</b> | <b>320,10</b> | <b>18</b> | <b>600,82</b> | <b>14</b> |

a) A-espectro de massa e tempo de retenção coincide com o padrão puro injectado; B-espectro de massa proposto pela base de dados Wiley 275; C-espectro de massa coincide com o espectro encontrado na literatura. vt- vestigial, área cromatográfica menor que  $1 \times 10^5$ .

Foram identificados um total de 108 compostos na composição volátil da maçã BE, 74 ésteres, 9 compostos terpénicos, 7 álcoois, 5 ácidos, 5 hidrocarbonetos aromáticos, 4 fenóis, 3 aldeídos e 1 cetona. As famílias responsáveis pela quase totalidade da área cromatográfica total são os ésteres e os compostos terpénicos, que representam 40-54% e 45-59%, respectivamente.

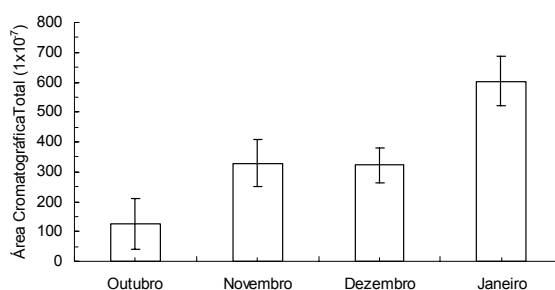
Os ésteres com maior percentagem de área são o hexanoato de hexilo, 2-metil-butanoato de hexilo, hexanoato de butilo, butanoato de hexilo, octanoato de etilo, 2-metil-butanoato de butilo, acetato de hexilo, hexanoato de etilo, butanoato de butilo, 2-metil-butanoato de etilo, acetato de 2-metil-butilo e butanoato de etilo. Todos estes compostos, com excepção do 2-metil-butanoato de hexilo, octanoato de etilo e 2-metil-butanoato de butilo, são compostos descritos como contribuindo individualmente para o aroma da maçã, com descritores de aroma frutados e florais [3]. O 2-metil-butanoato de etilo e acetato de 2-metil-butilo foram descritos como sendo os que mais contribuem para o aroma das maçãs “Fuji” [11,12].

Foi identificado um éster que pertence à família dos compostos de enxofre, o 3-metiltio-propanoato de etilo. Os compostos que pertencem a esta família são conhecidos por possuírem limites de percepção sensorial muito baixos ( $\mu\text{g/L}$ , em água) [13] e os descritores de aroma encontrados para este composto são o cítrico e o frutado, pelo que é provável que o 3-metiltio-propanoato de etilo seja um composto importante no aroma da maçã BE.

O *E,E*- $\alpha$ -farneseno é o composto maioritário do cromatograma, o que está de acordo com o facto deste composto ser o composto maioritário característico das frutas pomóideas [3], onde se incluem as maçãs. Os restantes compostos terpénicos o limoneno, o ocimeno, o cimeno, o *trans*- $\alpha$ -bergamoteno, a geranyl acetona, o nerolidol, o farnesol e a dendrolasina, representam uma pequena percentagem de área total. Alguns destes compostos têm limites de percepção sensorial muito baixos ( $\mu\text{g/L}$ , em água) e descritores de aroma a cítrico e floral [13], facto pelo qual se tem dado um destaque especial a estes compostos.

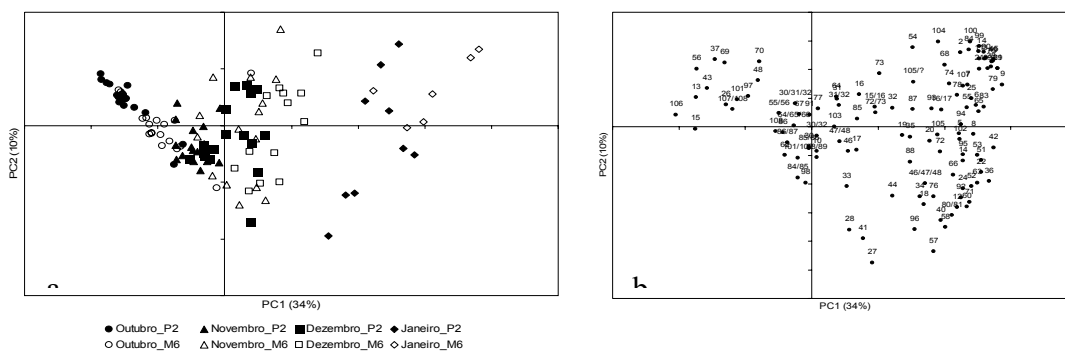
### 3.2. Efeito do armazenamento a 4°C na composição volátil da maçã ‘Bravo de Esmolfe’

Pela Figura 1 verifica-se um aumento na área total dos compostos voláteis ao longo do armazenamento. Este aumento é mais visível dos meses de Outubro para Novembro e de Dezembro para Janeiro. De acordo com a tabela 1, este comportamento deve-se principalmente ao aumento dos ésteres e dos compostos terpénicos. O aumento da área cromatográfica total dos ésteres observado ao longo do armazenamento foi também referido por outros autores em maçãs de outras variedades [8,14,15]. O aumento de área mais significativo foi observado para o hexanoato de etilo, composto considerado na literatura como muito importante no aroma das maçãs, cujo descriptor se caracteriza por aroma a maçã, verde e doce [3]. Na família dos compostos terpénicos o aumento mais significativo foi observado para o *E,E*- $\alpha$ -farneseno, podendo estar o seu aumento relacionado com a proximidade da senescência [9].



**Figura 1** – Áreas cromatográficas totais dos compostos voláteis e semi-voláteis da maçã BE, observadas ao longo dos quatro meses de armazenamento a 4°C.

Com o objectivo de estudar as principais fontes de variabilidade presentes nos dados obtidos assim como estabelecer relações entre as amostras em cada fase de análise e os diferentes compostos identificados, foi aplicada uma análise por componentes principais aos dados obtidos para o porta-enxerto PAJAM2 e para o porta-enxerto MM106 (Figura 2). Na Figura 2a observa-se que o PC1 explica 34% da variabilidade das amostras, podendo ser definidos três grupos. O grupo situado no PC1 negativo corresponde às amostras do mês de Outubro; o grupo situado próximo da origem corresponde às amostras de Novembro e Dezembro; o grupo situado no PC1 positivo corresponde às amostras de Janeiro. Ou seja, observa-se uma clara distinção entre as amostras analisadas em Outubro (logo após a colheita) e as amostras analisadas em Janeiro (após 4 meses de armazenamento a 4°C). A observação da Figura 2a permite também verificar que não é possível distinguir maçãs provenientes dos diferentes porta-enxertos, confirmando assim o resultado obtido para o teste de *t* emparelhado aplicado. Pela análise das contribuições factoriais (Figura 2b) as amostras de Outubro relacionam-se com aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos e fenóis. As amostras do mês de Janeiro, estão relacionadas com a maioria dos ésteres e compostos terpénicos. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, em que os aldeídos têm sido relacionados com estados de maturação precoce das maçãs [3], sendo observada a sua diminuição ao longo do armazenamento a frio [3,15]. O teor de ésteres está relacionado com os estados de maturação mais avançados das maçãs [3,15].



**Figura 2** – Análise por componentes principais das áreas normalizadas de todos os compostos identificados, nos quatro meses de armazenamento a 4°C, para o porta enxerto PAJAM2(P2) e MM106 (M6). (a) coordenadas factoriais, (b) contribuições factoriais.

### 3.3. Perfil volátil da maçã ‘Bravo de Esmolfe’

O perfil volátil das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ é constituído pelo *E,E*- $\alpha$ -farneseno, por uma numerosa família de ésteres e por outros compostos das famílias dos compostos terpénicos, álcoois, ácidos, hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, aldeídos e cetonas. Alguns destes compostos são comuns com outras variedades de maçãs e têm sido referidos como compostos que contribuem individualmente para o aroma. Foram, no entanto, identificados pela primeira vez na composição volátil das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’ compostos que pertencem a famílias que se caracterizam por possuírem limites de percepção sensorial baixos, como sejam os compostos terpénicos e os compostos de enxofre: ocimeno, cimeno, *trans*- $\alpha$ -bergamoteno, geranil acetona, nerolidol e farnesol e o éster 3-metiltio-propanoato de etilo. Estes compostos, que apresentam descritores de aroma cítricos e florais podem estar relacionados com o aroma varietal das maçãs ‘Bravo de Esmolfe’.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao projecto AGRO N°158 pelo apoio financeiro e à Eng.<sup>a</sup> Arminda da DRABL pelo fornecimento das maçãs usadas.

#### 4. Referências

- [1] – S.F.A.R. Reis, – Dissertação de mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos, Universidade de Aveiro, Portugal (2006).
- [2] – P.S. Dimick, J.C. Hosckin – Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **18** (1981) 387.
- [3] – I.D. Morton, A.J. Macleod (Ed.) – *Food Flavors- Part C- The Flavour of Fruits*, Elsevier (1990).
- [4] – J. Dixon, E.W. Hewett – New Zeal. Crop Hort., **28** (2000) 155.
- [5] – J.P. Mattheis, J.K. Fellman – Postharvest Biol. Technol., **15** (1999) 227.
- [6] – F. Augusto, A.L. Lopes, C.A. Zini – Trends Anal. Chem., **22** (2003) 160.
- [7] – A.J. Matich, D.D. Rowan, N.H. Banks – Anal. Chem., **68** (1996) 4114.
- [8] – S. Lurie, C. Pre-Aymard, U. Ravid, O. Larkov, E. J. Fallik – Agric. Food Chem., **50** (2002) 4251.
- [9] – G. Paliyath, M.D. Whiting, M.A. Stasiak, D.P. Murr, B.S. Clegg – Food Research International, **30** (1997) 95.
- [10] – S. Rocha, P. Coutinho, A. Barros, M. A. Coimbra, I. Delgadillo, A. D. Cardoso, – J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 4802.
- [11] – G. Echeverría, M.T. Fuentes, M.L. López – J. Sci. Food Agric. **84** (2003) 5.
- [12] – P. Komthong, S. Hayakawa, T. Katoh, N. Igura, M. Shimoda – Lebensm.-Wiss. u- Technol., **39** (2006) 472.
- [13] – H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle – *Food Chemistry*. Springer Verlag (2004).
- [14] – J.P. Mattheis, D.A. Buchanan, J.K. Fellman – J. Agric. Food Chem, **43** (1995) 194.
- [15] – R.L. Rouseff, M.M. Leahy (Ed) – *Fruit Flavors- Biogenesis, Characterization, an Authentication*, American Chemical Society (1995).

# MICROBIAL ECOLOGY OF TRADITIONAL AZOREAN SOURDOUGH STARTERS – FIRST APPROACH

Dapkevicius, E.M.L.N.<sup>1\*</sup>, Silva<sup>1</sup>, C.C.G., Dapkevicius, A.<sup>1</sup>, Callejo-González, M. J.<sup>2</sup> and Diez-Diez, T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CITA-A, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias  
Terra Chã, 9701-851 Angra do Heroísmo

Tel +351-295 402 200 Fax + 351-295 402 205 e-mail: mariaenes@notes.angra.uac.pt

<sup>2</sup> Dpto. Tecnología de Alimentos, Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos, Ciudad Universitaria, sn, 28040 Madrid, Spain

**Palavras-chave:** wheat sourdough, microbial ecology, yeasts, lactic acid bacteria, traditional products

**Summary:** In Azores, Portugal, bread making was mostly carried out at each household, making use of traditional starters. This practice, common until the middle of the 20th century, is now rare. However, homemade sourdough bread is still highly appreciated by consumers. Traditional bread starters were obtained by natural fermentations using readily available, cheap substrates such as pumpkin, sweet potato, potato or maize flour. Studies on the microflora of traditional Azorean bread starters are important because they provide knowledge aimed at the conservation of heritage, the preservation of microbial biodiversity and may aid in improving bread quality by providing new starter microorganisms with interesting technological properties.

The objective of this study was to gain a first insight into the microbial ecology of traditional Azorean bread doughs and starters and to start a collection of cultures, both with the aim of providing the basis for further studies and preserving microbial biodiversity.

The microbial ecology of potato-based and maize-flour-based bread starters from Terceira Island (Azores, Portugal) and the microbial ecology of the doughs thereof were studied throughout the bread making process. Microorganisms (aerobic mesophiles, lactobacilli, lactococci, enterococci, leuconostocs, staphylococci and yeasts) were quantified by plate count in adequate media. A collection of more than 140 isolates was obtained. Sixty-six isolates were already identified via API BioMérieux galleries, following preliminary biochemical and morphological screening.

Lactic acid bacteria and yeasts were the dominant groups. In bread making with potato-based starters, the main microorganisms present were *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyverii*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus*. In bread making with maize-flour-based starters, the main isolates obtained were *Candida sake*, *Candida valida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus curvatus*, and *Pediococcus* spp.

## 1. INTRODUCTION

Sourdough is a natural ecosystem in which the metabolic activities of yeasts and lactic acid bacteria influence the particular characteristics of the final product<sup>1</sup>. Yeast species such as *Candida milleri*, *Candida pelliculosa*, and *Saccharomyces cerevisiae* have been identified in wheat sourdough<sup>2</sup>. Among the lactic acid bacteria (LAB), lactobacilli were found to predominate in sourdoughs, because they are very competitive and well adapted to the substrate. However, other genera, such as *Leuconostoc*, *Weissella* and *Pediococcus* can also be found. *Enterococcus* and *Streptococcus* are less common in sourdoughs<sup>3</sup>. Lactobacilli contribute to the flavor and taste of sourdough breads, as well as to the technological properties and prebiotic activity of sourdoughs, because they metabolize maltose and amino acids<sup>4</sup>. LAB in sourdough also result in improved nutritional properties. For instance, they can degrade phytic acid<sup>5</sup>. Sourdough breads have long shelf lives, also as a result of the microbial activities of LAB<sup>6</sup>.

In Azores, Portugal, bread making was mostly carried out at each household, making use of traditional starters that were handed down from generation to generation. This practice, common until the middle of the 20th century, is now becoming increasingly rare. However, homemade sourdough bread is still highly appreciated by Azorean consumers. Traditional bread starters were obtained by natural fermentations using readily available, cheap substrates, such as pumpkin, sweet potato, potato or maize flour. Although data on the microflora of traditional maize sourdoughs from the Portuguese Mainland have already been published<sup>7</sup>, studies on Azorean bread starters have not yet been carried out. They are, however, important because they provide knowledge aimed at the conservation of heritage, the preservation of microbial biodiversity and may aid in improving industrial bread quality by making available new starter microorganisms with interesting technological properties.

The objective of this study was to gain a first insight into the microbial ecology of traditional Azorean bread doughs and starters and to start a collection of cultures, both with the aim of providing the basis for further studies and preserving microbial biodiversity.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

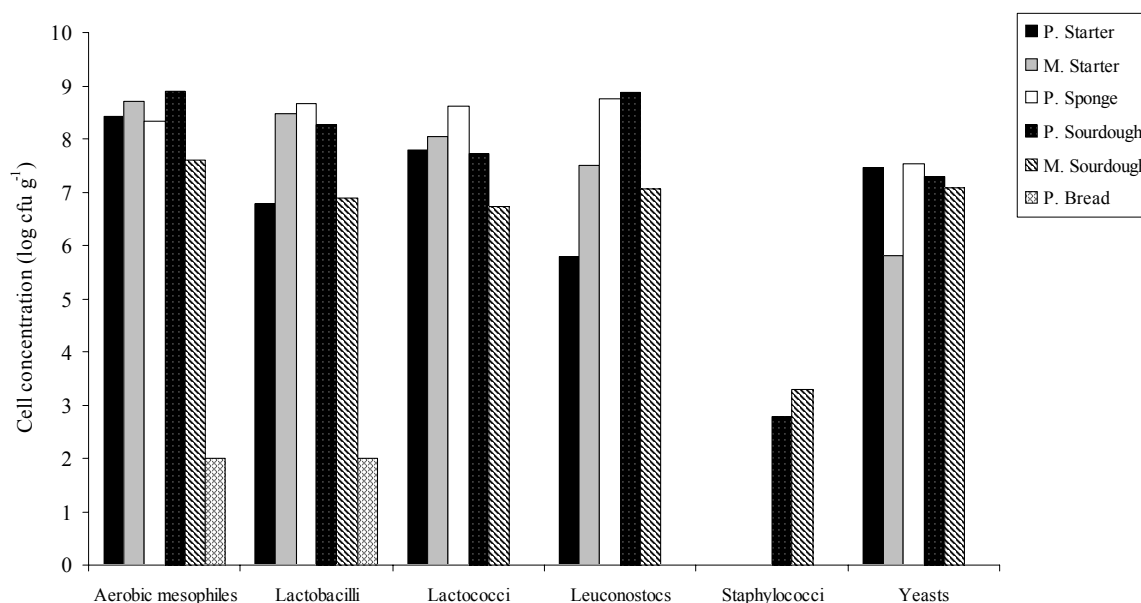
**2.1. Starters and sourdough preparation:** Maize-flour-based and potato-based sourdough starters were obtained initially from families in Terceira Island (Azores, Portugal) and were kept active by adding fresh substrate every week. After adding fresh substrate, the starters were incubated at 30 °C for 18 – 24 h and were subsequently kept at 4 °C, for a maximum of 7 days, if not intended for immediate use. Sourdoughs were prepared using freshly fermented starters. For the preparation of sourdough from maize-flour-based starters, water, wheat flour, starter, freeze-dried commercial yeast, sugar and salt (300:500:30:3:35:11, on a weight basis) were mixed in a domestic bread machine, using the “whole meal” program (1 h kneading, 50 min resting, 1 h baking). About 1 kg of dough was baked on each machine cycle. For the preparation of bread from the potato-based sourdough, a sponge was prepared first, by mixing starter and wheat flour (6:5, w/w), kneading and allowing fermentation for 15 h at room temperature (17 – 20 °C). From this sponge, the final dough was prepared from water, wheat flour, sponge, salt and freeze-dried commercial yeast (300:250:125:11:1, on a weight basis), using the same bread machine and program as for the sourdough prepared from maize-flour-based starter.

**2.2. Microbiological analyses and pH:** Microbial counts were performed on samples of starters, sponges, sourdoughs and baked breads for each type of starter under study. Yeasts were counted in Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid), aerobic mesophiles in Plate Count Agar (Merck), lactobacilli in Rogosa Agar (Merck), leuconostoc in MSE Agar (Biokar), lactococci in M17 Agar, enterococci in Slanetz-Bartley Agar (Merck) and Staphylococci in Mannitol Salt Phenol Red Agar (Merck). Five colonies from each countable plate were purified in suitable agar media. Selected purified bacterial cultures were then identified by morphology, Gram-stain, catalase test, oxidase test, fermentation type (homo-/heterofermentative) and the suitable API kit (API 50CHL, API Staph, API 20 Strep) (BioMérieux). Yeast pure cultures were identified by the API 32C kit (BioMérieux). The pH of the samples was also measured.



### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of microbial counts throughout bread making are shown in figure 1. LAB were the predominant bacteria in all steps of bread making with both types of starter under study. In our study, lactobacilli, lactococci and leuconostocs were present in similar, high numbers throughout the bread making process, while other authors state that lactobacilli predominate<sup>3</sup>. It is interesting to note that some lactobacilli survived the baking process and were detected in the breads prepared from potato-based starters. No enterococci were detected in any of the analysed samples (data not shown). Presumptive staphylococci were only present in sourdoughs, but in very small numbers. Yeasts were present in high numbers, but were not as numerous as LAB.



**Figure 1.** Numbers of aerobic mesophiles, yeasts, presumptive lactobacilli, lactococci, leuconostocs, and staphylococci throughout the various stages of sourdough bread making with traditional Azorean potato-based and maize-flour-based starters. In the legend, the letter P indicates the bread making steps with potato-based starters, whereas the letter M indicates the corresponding steps with maize-flour-based starters.

Table 1 shows the results of the identification of bacterial and yeast isolates obtained from samples taken throughout both baking processes under study. Although most isolates obtained from potato-based starters were *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* was the most frequent isolates in later bread making stages from this type of starter. *Leuconostoc* and *Pediococcus* species were also present in this process. *Lactobacillus delbrueckii* was found in baked breads prepared from potato-based starters, indicating it can survive the baking process. *Lactobacillus curvatus* predominated in the bread making from maize-flour-based starters. *Pediococcus pentosaceus* was also found in maize-flour-based starters, but not in the sourdough thereof. *Saccharomyces cerevisiae* was the most frequent yeast isolate in bread making with potato-based sourdough starters. *Saccharomyces kluyverii* was found only in starters, but not in later stages. In the bread making with maize-flour-based starters *S. cerevisiae* was also found, however, other yeasts were important too (*Saccharomyces kluyverii* and *Candida* spp.). *Saccharomyces* and *Candida* species have been found in sourdoughs from different geographic origins and/or different composition<sup>2,7</sup>. The

predominance of homofermentative LAB in potato-based starters may account for their lower pH values when compared to maize-flour-based starters. Sourdoughs obtained from potato-based starters also had lower pH values than those prepared from maize-flour-based starters. The only LAB species identified in maize-flour-based starters was a heterofermenter, whereas in sourdoughs prepared from potato-based starters homofermenters were also identified.

This study seems to indicate that the microbial ecology of bread making with maize-flour-based starters and with potato-based starters differs considerably. It provided the first steps towards understanding and conserving the biodiversity of traditional sourdough starters.

**Table 1.** Microbial genera/species identified and pH values obtained throughout the various stages of sourdough bread making with traditional Azorean potato-based and maize-flour-based starters. The letter P indicates the bread making steps with potato-based starters, whereas the letter M indicates the corresponding steps with maize-flour-based starters.

| <b>Sample</b> | <b>Bacterial genus/species</b>  | <b>Yeast species</b>  | <b>pH</b> |
|---------------|---|---|-----------|
| P. starter    | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (13)<br><i>Leuconostoc mesenteroides</i><br>ssp. <i>mesenteroides</i> (1) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (6)<br><i>Saccharomyces kluyverii</i> (2)                                   | 4.0       |
| M. starter    | <i>Lactobacillus curvatus</i> (4)<br><i>Pediococcus</i> spp. (1)  | <i>Candida valida</i> (1)<br><i>Candida sake</i> (1)<br><i>S. cerevisiae</i> (1)<br><i>S. kluyverii</i> (1) | 4.6       |
| P. sponge     | <i>Lb. plantarum</i> (5)  | <i>S. cerevisiae</i> (4)  | 3.9       |
| P. sourdough  | <i>Lb. plantarum</i> (4)<br><i>P. pentosaceus</i> (1)   | <i>S. cerevisiae</i> (4)  | 4.5       |
| M. sourdough  | <i>Lb. curvatus</i> (4)   | <i>S. cerevisiae</i> (3)<br><i>S. kluyverii</i> (2)<br><i>Candida melibiosa</i> (1)                         | 5.0       |
| P. bread      | <i>Lb. delbrueckii</i> (1)  | Not present   | 5.0       |

#### Reference

- [1] – O. Pepe, G. Blaiotta, M. Anastasio, G. Moschetti, D. Ercolini, F. Villani – Appl. Microbiol. Chem. **27** (2004) 433
- [2] – K. Katina – *Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread*, VTT Publications (2005)
- [3] – L. De Vuyst, P. Neysens – Food Sci. Technol. **16** (2004) 43
- [4] – R. F. Vogel, M. A. Ehrmann, M. G. Gänzle – Ant. v. Leeuwenhoek **81** (2002) 631
- [5] – M. Gobetti, M. de Angelis, A. Corsetti, R. di Cagno – Food Sci. Technol. **16** (2004) 57
- [6] – B.J.B. Wood (ed.) – *Microbiology of fermented foods*, Chapman and Hall, London (1997)
- [7] – J. M. Rocha, F. X. Malcata – J. Food Prot. **62** (1999) 1416

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO PRODUTO TRADICIONAL “CHOURIÇA DE CARNE” DE MELGAÇO

*Santos<sup>1</sup>, D.; Mendes<sup>2</sup>, E.; Afonso<sup>1</sup>, I.M.; Casal<sup>2</sup>, S.; Oliveira<sup>2</sup>, M.B.P.P.; Brito<sup>\*1</sup>, N.V.*

<sup>1</sup> Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Quinta do Convento, Refóios, 4990-706 Ponte de Lima, Portugal.

Tel +351-258 909740 Fax +351-258 909779 e-mail: [nunobrito@esa.ipv.pt](mailto:nunobrito@esa.ipv.pt)

<sup>2</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, R.

Aníbal Cunha, 164, 4099-030 PORTO

Tel +351-222078902 Fax +351-222003977 e-mail: [beatoliv@ff.up.pt](mailto:beatoliv@ff.up.pt)

**Palavra-chave:** Chouriça de carne, Bísaro, caracterização sensorial, caracterização físico-química, perfil lipídico.

**Resumo:** A valorização dos produtos tradicionais, baseados em recursos locais e preservando património genético autóctone, constitui um vector importante em políticas de sustentabilidade dirigidas a zonas rurais mais desfavorecidas. O objecto deste estudo prende-se com a caracterização sensorial e química da chouriça de carne do “Fumeiro de Melgaço”, analisando distintos factores intervenientes (tipo de fabrico e matéria-prima).

A metodologia utilizada para a caracterização dos atributos sensoriais foi a Análise Descritiva Quantitativa. Na caracterização físico-química foram determinados os parâmetros pH, teores de humidade, proteína, matéria gorda, perfil lipídico, cloretos, cinza e hidroxiprolina. Recorreu-se na análise estatística ao programa SPSS 13.0 for Windows.

Constata-se, no perfil sensorial, que, à excepção das chourriças de carne não Bísaro de fabrico tradicional, as configurações relativas aos diferentes atributos apresentam elevada variabilidade, explicadas pela sazonalidade e diversidade na técnica de fabrico. A análise dos componentes principais mostra que sabor, aroma e textura são atributos valorizados pelo painel de provadores e tenrura um atributo depreciado. Observa-se, na análise físico-química, que a chouriça de carne Bísara, apresenta teor médio de proteína (fabrico), elevado teor de matéria gorda (raça), baixo teor de humidade e teores de cloretos mais elevados (tipo caseiro).

Relativamente ao perfil lipídico foram detectados 65 ácidos gordos diferentes, com apenas 22 em teores superiores a 0,05%. De referir a presença de teores inferiores de PUFA em “chouriça de carne” produzida à base de animais de raça Bísara e de teores mais elevados em amostras provenientes de tipo de fabrico industrial e raças suínas comerciais.

Constata-se a influência do tipo do fabrico e raça, sob o ponto sensorial e físico-químico, para a identidade da chouriça de carne de Melgaço, sendo necessário maior investigação e normalização dos processos de produção, abate e fabrico de forma a reduzir variabilidade e reforçar a qualidade nutricional.

## 1. INTRODUÇÃO

Recursos locais, como os produtos tradicionais, possuem um relevante impacto económico no desenvolvimento sustentado, promovendo novas oportunidades no Mundo Rural e aproximando novos públicos, nomeadamente consumidores urbanos. Consequentemente, a

valorização dos produtos regionais consiste numa das prioridades mais relevantes na definição de estratégias de desenvolvimento rural.

A qualidade das “chouriças de carne” depende de diferentes factores, entre os quais a carne e gordura desenvolvem um papel predominante. Estes factores podem ser influenciados pelo genótipo, sexo, peso vivo ao abate, sistemas de produção e de estabulação e alimentação.

*Chouriça de carne de Melgaço* é uma chouriça de carne produzida na região de Melgaço, no Norte de Portugal. Consiste numa mistura de carnes, exclusivamente de porco de raça Bísara ou de um seu cruzamento, proveniente de diferentes regiões (lombo, lombelos, cachaço, toucinho), aparas e gorduras em pedaços pequenos, complementada com condimentos como alho, cebola, colorau doce e/ou picante, sal, louro, vinho da região e água (nas terras altas). Tradicionalmente, o “Fumeiro de Melgaço” é produzido a partir de carne Bísara (*Sus celticus*), uma raça suína autóctone do Norte de Portugal e Galiza.

Num contexto de valorização de produtos regionais e de recuperação e melhoramento de raça autóctone é crucial promover a caracterização sensorial e físico-química do produto. O objectivo deste trabalho é proceder à caracterização da “chouriça de carne”, por análise sensorial e físico-química (incluindo perfil lipídico), avaliando o efeito da raça suína autóctone (Bísara ou não-Bísara) na composição final e aceitação do consumidor.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Tipos de fabrico**

Procedeu-se à avaliação da influência de dois tipos de fabrico, o industrial e o tradicional, tendo em conta as unidades de transformação das respectivas amostras. As chouriças de carne de fabrico industrial, foram provenientes de uma unidade Tipo 3 (Dec. Reg. nº8/2003, de 11 de Abril) e as de fabrico tradicional compreendem duas escalas produtivas: a caseira, laboração inferior a 3000 kg/ano (Decreto de Lei nº57/99, de 1 de Março), denominados como “estabelecimentos de venda directa”; e a tradicional, propriamente dita, unidades que laboram pelo menos 10000 kg/ano (Tipo 4) (Portaria nº 464/2003, de 6 de Junho).

### **2.2. Raça**

Para a avaliação da influência da raça no produto final, para os tipos de fabrico caseiro e tradicional, foram adquiridas chouriças de carne produzidas com porco de raça Bísara, ou seu cruzamento com porcos de raças comerciais (especialmente Large White, Land Race e Pietrán). Para as chouriças de carne de fabrico industrial foram adquiridas amostras produzidas com carne de porco de raças comerciais.

### **2.3. Amostragem**

Foram adquiridas 22 amostras chouriças de carne, equitativamente divididas quanto à raça, de 10 produtores de fabrico caseiro e de dois produtores de fabrico tradicional. Quanto ao fabrico industrial, foram adquiridas 11 amostras de chouriças de carne produzidas com carne de porco de raças comerciais.

### **2.4. Análise sensorial**

A metodologia utilizada para a caracterização dos atributos sensoriais das diferentes chouriças de carne foi a Análise Descritiva Quantitativa (QDA), quantificando as intensidades relativas sobre uma escala estruturada de 7 pontos <sup>(1)</sup>. A geração do vocabulário foi realizada de acordo com a metodologia preconizada na Norma Afnor V09-021 <sup>(1)</sup>, adaptada para avaliação de salpicão <sup>(2)</sup>. Assim, foi elaborada uma ficha de 14 descritores agrupados em quatro blocos relacionados com atributos de Aparência, atributos de Aroma, atributos de Textura e atributos de Sabor. O painel de provadores foi constituído por 14 provadores qualificados (NP ISO 8586-1:2001). Uma sessão de formação foi efectuada inicialmente para orientar os provadores relativamente à ficha de prova. Foram realizadas duas provas sensoriais, uma no Verão e

outra no Inverno para avaliar a ocorrência de variações nos atributos dos produtos devido a factores relacionados com o fabrico e desempenho dos provadores.

### **2.5. Análises físico-químicas**

Na preparação da amostra para as análises físico-químicas, cada amostra foi picada e homogeneizada mecanicamente para minimizar a heterogeneidade do produto, e posteriormente foi acondicionada sob vácuo e conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à altura de efectuar as análises. Foram determinados os seguintes parâmetros: pH (NP 3441; 1990), humidade (NP 1614; 2002), proteína (prNP 1612; 2002), matéria gorda (método de Pearson, adaptado por Leon Crespo; 1973), cloretos (NP 1845; 1982), cinza (NP 1615; 2002) e hidroxiprolina (NP 1987; 2002).

Na determinação do perfil lipídico por cromatografia gasosa (Chrompack CP-9001, Holanda), com detecção por ionização em chama, os ácidos gordos foram convertidos em ésteres metílicos por transesterificação alcalina directa com metóxido de sódio (0,5M) ( $50^{\circ}\text{C}$ , 30 min.). Para a sua separação utilizou-se uma coluna CP-Sil 88 (50m, Varian), inicialmente a  $160^{\circ}\text{C}$  (5 min), seguida de aumento para  $220^{\circ}\text{C}$  a  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . O detector e as temperaturas de injeção foram conjugados a  $250^{\circ}\text{C}$ . Os ácidos gordos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de misturas padrão comerciais, com uma amostra certificada (BCR-163) e valores publicados na literatura. A quantificação dos FAME foi efectuada como a percentagem relativa da soma dos ácidos gordos identificados (% m/m).

Para todos os parâmetros analisados foram efectuados triplicados para assegurar a repetibilidade das amostras.

### **2.6. Análise estatística**

Para a análise estatística, recorreu-se aos programas Microsoft Excel do Office 2003 e SPSS 13.0 for Windows, realizando-se estatística exploratória (Tukey), análise de variância univariada e multivariada e comparação de médias. Foram calculados, ainda, indicadores de tendência central e indicadores de dispersão. Análise de componentes principais (ACP) foi também usada para reduzir o número de variáveis, determinar combinações lineares dessas variáveis e explicar a maioria da variabilidade.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Análise sensorial**

Os resultados da análise sensorial (Quadro 1) mostram que os provadores, relativamente às amostras presentes, constataram existir diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os parâmetros, à excepção dos atributos marmoreado, suculência e adocicado. Estes resultados, devido à variabilidade das amostras, podem ser minimizados, uma vez que, analisando a interacção amostra\*provador, apenas foram encontradas diferenças significativas para o atributo picante. Na avaliação do painel sensorial, este tipo de chouriça de carne foi aceite, numa análise global, preferindo atributos relacionados com o sabor (intensidade, evidenciando o efeito da raça Bísaro e picante), aroma e textura (firmeza) e discrimina, numa apreciação negativa, a tenrura.

### **3.2. Análise físico-química**

Os resultados referentes à análise físico-química representam-se nos Quadros 2 e 3. Considerando a raça utilizada como matéria-prima (Quadro 2), observa-se a presença de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os parâmetros analisados, com excepção do teor de hidroxiprolina. Nos parâmetros que compreendem diferenças significativas, à excepção do teor de humidade, a raça Bísaro apresenta os valores mais elevados. Comparando o tipo de fabrico (Quadro 3) observa-se a presença de diferenças significativas em todos os parâmetros analisados, com excepção do teor de cinzas

O perfil lipídico apresenta-se no Quadro 4, constatando-se uma composição mais elevada em ácidos gordos saturados em produtos provenientes de animais de raça Bisara, assim como de processo de fabrico caseiro e um valor inferior em ácidos gordos poliinsaturados em “chouriça de carne” elaborada à base de Bísaro, evidenciando-se, ainda, o método de fabrico industrial como o de maior contributo para a presença de PUFA.

#### 4. CONCLUSÕES

A identidade da chouriça de carne de Melgaço, sob o ponto de vista sensorial e físico-químico, carece de uma normalização e controlo dos processos de fabrico e da origem da matéria-prima, no sentido de obter produtos de qualidade com características mais estáveis no tempo permitindo deste modo fidelizar consumidores. Considera-se importante estabelecer critérios comuns ao nível do fabrico e uso de matéria-prima de forma a reduzir a variabilidade existente entre produtores e épocas do ano, no sentido de reforçar as características nutricionais, especialmente no seu teor lipídico, da “chouriça de carne” de Melgaço.

##### Referências

[1] - PATARATA, L.A.S.C.- *Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e micrococcaceae em produtos de salsicharia: efeito da sua utilização em culturas de arranque e de formulação acidificante no fabrico de linguiça tradicional transmontana*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciência Alimentar, UTAD, Vila Real, 262 p (2002).

[2] - MARTINS, C. - *Avaliação sensorial de alimentos*, UTAD, Vila Real, 39pp (1990).

**Quadro 1** – Avaliação do desempenho dos provadores no perfil sensorial.

|           |             | F <sub>amostra</sub> | F <sub>provador</sub> | F <sub>amostra*provador</sub> |
|-----------|-------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Aparência | Cor         | 7,69*                | 1,95*                 | 1,18                          |
|           | Marmoreado  | 6,91*                | 1,33                  | 0,96                          |
| Aroma     | Intensidade | 8,01*                | 7,20*                 | 1,18                          |
|           | Curado      | 0,48                 | 2,58*                 | 0,65                          |
|           | Fermentado  | 0,88                 | 4,96*                 | 0,53                          |
|           | Ranço       | 7,81*                | 4,21*                 | 0,93                          |
| Textura   | Suculência  | 3,57*                | 1,24                  | 1,38                          |
|           | Firmeza     | 1,29                 | 2,63*                 | 1,03                          |
|           | Tenrura     | 1,7                  | 6,77*                 | 0,97                          |
| Sabor     | Intensidade | 1,63                 | 1,57*                 | 0,89                          |
|           | Acidez      | 7,53*                | 2,79*                 | 1,29                          |
|           | Picante     | 3,02*                | 11,41*                | 2,01*                         |
|           | Adocicado   | 6,72*                | 2,53                  | 1,15                          |
|           | Salga       | 2,13*                | 3,86*                 | 1,41                          |

\* Significância para 5% de probabilidade (p < 0,05), pelo teste t Student

**Quadro 2** – Média e desvio padrão da composição química em função do efeito da raça na chouriça de carne.

|            | pH                     | Humidade                 | Proteína                | Mát. Gorda               | Cloretos               | Cinzas                 | Hidroxiprolina         |
|------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Bísaro     | 5,42±0,16 <sup>a</sup> | 27,68±5,79 <sup>b</sup>  | 33,74±9,08 <sup>a</sup> | 40,76±12,82 <sup>a</sup> | 3,26±1,59 <sup>a</sup> | 5,07±1,49 <sup>a</sup> | 0,32±0,13 <sup>a</sup> |
| Não Bísaro | 5,29±0,22 <sup>b</sup> | 36,36±10,71 <sup>a</sup> | 30,25±6,17 <sup>b</sup> | 28,96±6,04 <sup>b</sup>  | 2,61±0,29 <sup>b</sup> | 4,41±0,42 <sup>b</sup> | 0,35±0,10 <sup>a</sup> |

Médias na mesma linha com letras diferentes (a- b) são significativamente diferentes (p < 0,05)

**Quadro 3** – Média e desvio padrão da composição química em função do efeito tipo de fabrico da chouriça de carne

|             | pH                     | Humidade                | Proteína                | Mát. Gorda               | Cloretos               | Cinzas                 | Hidroxiprolina         |
|-------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Caseiro     | 5,37±0,14 <sup>b</sup> | 24,44±4,03 <sup>c</sup> | 31,63±7,23 <sup>b</sup> | 39,08±13,06 <sup>a</sup> | 3,24±1,47 <sup>a</sup> | 4,80±1,55 <sup>a</sup> | 0,36±0,15 <sup>a</sup> |
| Industrial  | 5,43±0,06 <sup>a</sup> | 50,08±1,20 <sup>a</sup> | 28,31±1,46 <sup>c</sup> | 16,94±1,79 <sup>b</sup>  | 2,44±0,10 <sup>b</sup> | 4,67±0,19 <sup>a</sup> | 0,28±0,08 <sup>b</sup> |
| Tradicional | 5,27±0,28 <sup>c</sup> | 32,74±3,60 <sup>b</sup> | 33,33±9,24 <sup>a</sup> | 34,29±7,69 <sup>a</sup>  | 2,72±0,22 <sup>b</sup> | 4,55±0,55 <sup>a</sup> | 0,34±0,08 <sup>a</sup> |

Médias na mesma linha com letras diferentes (a- c) são significativamente diferentes (p < 0,05)

**Quadro 4** – Média e desvio padrão do perfil lipídico em função do efeito raça

|                        | SAT                     | MUFA                    | PUFA                    | trans                  |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Caseiro Bísaro         | 36,96±0,66 <sup>a</sup> | 47,26±1,16 <sup>a</sup> | 14,76±1,22 <sup>c</sup> | 0,72±0,11 <sup>a</sup> |
| Caseiro não Bísaro     | 37,66±0,73 <sup>a</sup> | 45,28±1,20 <sup>b</sup> | 16,44±1,02 <sup>b</sup> | 0,76±0,08 <sup>a</sup> |
| Tradicional Bísaro     | 37,53±0,65 <sup>a</sup> | 46,34±1,09 <sup>a</sup> | 14,98±0,45 <sup>c</sup> | 0,43±0,08 <sup>c</sup> |
| Tradicional não Bísaro | 33,69±0,73 <sup>b</sup> | 48,65±0,62 <sup>a</sup> | 16,38±0,45 <sup>b</sup> | 0,93±0,10 <sup>a</sup> |
| Industrial não Bísaro  | 33,29±0,76 <sup>b</sup> | 41,77±1,07 <sup>c</sup> | 23,76±1,45 <sup>a</sup> | 0,52±0,13 <sup>b</sup> |

Médias na mesma linha com letras diferentes (a- c) são significativamente diferentes (p <0,05)

## **OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM ÓLEOS E GORDURAS.**

*Takemoto<sup>1</sup>, E.; Prado<sup>1</sup>, M.A.; \*Godoy<sup>2</sup>, H.T.*

<sup>1</sup>Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos, São Paulo/SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências de Alimentos, Fac.de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil.  
[\\*helena@fea.unicamp.br](mailto:*helena@fea.unicamp.br)

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência foram testados alguns parâmetros cromatográficos (fase móvel, tamanho da coluna, eluição isocrática e por gradiente). Na otimização das condições para a separação simultânea dos antioxidantes sintéticos mais utilizados em alimentos, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de dodecila (DG), galato de propila (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ). Os resultados obtidos indicaram que as condições que apresentaram melhor separação dos antioxidantes foram com o emprego de coluna de fase reversa (Chromolith), 5µm., 100 mm x 4,6mm i.d., eluição por gradiente, iniciando com metanol e água (acidificada com ácido acético a 5%, até pH 3,1) 55:45, v/v, chegando com 10 minutos a 87:13, permanecendo nessas condições por 5 minutos e retornando as condições iniciais após 20 minutos de corrida, com vazão de 0,8 mL/min e detecção a 280 nm. Nessas condições os tempos de retenção para os antioxidantes foram de: 2,64; 3,60; 8,40; 15,04 e 16,63 minutos para o PG, TBHQ, BHA, BHT e DG, respectivamente.



# COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Laurus nobilis*

*Bouzouita<sup>1</sup>, N.; El Omri<sup>1</sup>, A.; Alvarenga<sup>2</sup>, N.; Canada<sup>2</sup>, J. et Chaabouni<sup>1</sup>, M.M.*

<sup>1</sup> Ecole Supérieure des Industries Alimentaires, 58, Avenue Alain Savary, 1003 Tunis, Tunisie.

<sup>2</sup> ADCTA, Escola Superior Agraria de Beja, Rua Pedro Soares, 7801-902 Beja, Portugal.

## RESUME

L'huile essentielle des feuilles de Laurier noble de la famille des Lauracées est obtenue par hydro distillation en utilisant un dean stark. Le rendement de l'extraction est de 0,75%. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier 21 composés, ce qui correspond à 96,36% de la totalité de l'huile. Les composés majoritaires sont : le linalool 10,04%, le méthyl Eugénol 20,30%, le eugénol 2,08% et l'acétate d'alpha-terpinyle 45,99%. Cette huile manifeste une activité antioxydante importante, en effet un suivi de l'indice de peroxyde d'un corps gras le saindoux maintenu à une température de 60°C pendant 20 jours et additionné d'huile essentielle de laurier à des concentrations de 0,02% et 0,04% d'une part et d'un antioxydant de synthèse le butyl hydroxytoluène à une concentration de 0,02% d'autre part a montré que la protection de ce corps gras de l'oxydation par l'huile essentielle à la concentration de 0,02% est équivalente à celle obtenue avec le butyl hydroxytoluène à la même concentration. La mesure de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de laurier a été réalisée d'autre part en suivant la diminution de la densité optique en fonction du temps du système  $\beta$ -carotène-acide linoléique en présence d'huile essentielle de laurier, de l'antioxydant de synthèse et d'un phénol l'eugénol.

**Mots clés:** *Laurus nobilis*, huile essentielle, composition chimique, activité antioxydante.

## INTRODUCTION

Lorsqu'ils sont extraits de leur contexte de protection naturelle, tous les corps gras (ou lipides ou matières grasses) subissent au cours de leur conservation ou de leur transformation des altérations de type oxydatif. L'autoxydation d'un corps gras est un phénomène purement chimique très complexe mettant en jeu des réactions radicalaires capables de s'auto-entretenir et qui ne nécessitent que la présence de l'oxygène atmosphérique (oxygène activé bi radicalaire). Les premiers produits formés instables sont des composés peroxydiques : les hydro peroxydes, dont la structure va dépendre de la nature des acides gras attaqués (acides mono-, di-, tri- ou poly-insaturés). Les radicaux alcooxyles qui en dérivent par scission, conduisent à de multiples produits secondaires dont la nature et les proportions dépendent de différents paramètres. Parmi ces produits, apparaissent des molécules volatiles (aldéhydes, hydrocarbures, alcools, acides...) qui modifient la flaveur d'origine et confèrent une odeur et un goût caractéristiques de rance. Le phénomène d'oxydation lipidique a donc une implication directe sur la valeur marchande des corps gras en l'état ou de tout produit, alimentaire ou non, formulé à partir de corps gras, l'apparition du défaut de rance étant une cause de dépréciation pouvant aller dans certains cas jusqu'au refus par le consommateur ou le transformateur industriel. Le technologue ou le formulateur doit tenir compte du fait que l'oxydation des corps gras est un phénomène spontané, donc inévitable dans l'absolu, mais dont la cinétique d'apparition peut être accélérée ou ralentie sous l'effet de différents paramètres : la nature des lipides et en particulier des acides gras, la température, la présence de lumière en particulier d'U.V. La présence de molécules antioxydantes a pour effet de ralentir l'attaque des chaînes grasses par l'oxygène [1]. Un antioxydant est une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir le phénomène d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit [2], celui-ci agit soit en bloquant la formation de radicaux libres (BHT, BHA,

gallates, tocophérols) on parle alors d'antioxydants de rupture de chaîne, soit en fixant directement l'oxygène (acide ascorbique), soit en chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation (acide citrique, lécithines) [2,3]. D'autres substances dites synergistes sont capables de régénérer un antioxydant vrai de type phénolique, sous sa forme active. Dans le monde végétal, en dehors des tocophérols (que l'on trouve en particulier dans les graines, mais aussi dans les feuilles) et de l'acide ascorbique, de nombreuses autres substances naturelles présentent des propriétés antioxydantes : poly phénols de l'olivier, du chêne, sésamol des graines de sésame, flavonoïdes des plantes (quercétine, myricétine, etc...), huiles essentielles extraites d'épices et d'herbes : thym, carvi, cumin, clou de girofle, romarin, sauge [4]. L'utilisation des molécules naturelles pour remédier au phénomène d'oxydation des corps gras, a fait l'objet de plusieurs recherches [5,8]. C'est dans cette optique que nous avons réalisé cette étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Laurus nobilis* sur une graisse animale le Saindoux de la comparer à celle d'un antioxydant de synthèse alimentaire : le Butyl hydroxytoluène BHT et à un phénol le eugénol.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Matériel végétal**

*Laurus nobilis* (le laurier noble ou laurier sauce) de la famille des Lauracées, plante cultivée de la région de l'Ariana. La collecte a été effectuée au mois de Novembre 2004.

Corps gras sélectionné

C'est un corps animal : le Saindoux.

### **Extraction de l'huile essentielle**

Les plantes aromatiques sont fraîchement récoltées et séchées dans un endroit aéré et à l'ombre. Elles sont débarrassées de leurs tiges, seules les feuilles sont utilisées dans ce travail. Le principe mis en œuvre est celui de l'hydro distillation réalisé en utilisant un Dean Stark : 100 g de matériel végétal sont placés dans un ballon de un litre contenant 300 ml d'eau. Le ballon est surmonté d'un Dean Stark et d'un réfrigérant ascendant. Le mélange est porté à reflux à l'aide d'un manteau chauffant. Les essences sont alors entraînées par la vapeur d'eau, condensées puis séparées par le Dean Stark. Le reflux est poursuivi jusqu'à ce que le distillat apparaisse parfaitement limpide. La décantation du distillat donne deux phases :

- Une phase organique sous forme d'une huile légèrement colorée et d'odeur assez forte.
- Une phase aqueuse qu'on extrait à l'éther diéthylique, dans le but d'augmenter le rendement en huile essentielle et qui donne après évaporation du solvant une deuxième phase organique qu'on regroupe avec la première, l'huile essentielle obtenue est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et conservée à une température de - 4°C.

### **Analyse chimique des deux huiles essentielles**

Notre échantillon a été analysé par CPG-SM sur un chromatographe HP6890 couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 piloté par micro-ordinateur. Les conditions d'analyses sont les suivantes:

- Colonne : HP- 5MS 5% phényl méthyl siloxane (30m×0,25µm, df =1 µm)
- Gaz vecteur : Hélium
- Mode : Split 1:50
- Débit : 1,2ml/min
- Température de l'injecteur : 200°C
- Température du détecteur : 250°C
- Programme de température : 40°C (1min)-3°C/min-220°C

Les identifications sont proposées sur une base d'analyse comparative des spectres enregistrés avec ceux de la bibliothèque spectrale WILEY238.L.

### **Mesure de l'état d'oxydation des lipides**

Il y'a diverses méthodes pour apprécier l'oxydation des lipides. Aucune ne donne de résultat absolu. On étudie généralement l'évolution d'un indice ou test. Dans ce travail, nous avons utilisés les deux méthodes suivantes :

#### **Indice de peroxyde (IP) –AFNOR T 60-220**

Il s'exprime en mg d'oxygène actif (ou oxygène peroxydique) par kg de matière grasse. On réduit les peroxydes avec de l'iodure de potassium qui s'oxyde lui-même en iode et c'est ce dernier que l'on dose. C'est un test très sensible et très utile pour apprécier les premières étapes d'une oxydation. 50g de corps gras sont mélangés à raison de 200 et 400 ppm d'huile essentielle ou de 200 ppm de BHT et placés à l'étuve à une température de 60°C pour accélérer le processus d'oxydation. Un « échantillon témoin », corps gras non stabilisé, est placé dans la même étuve à la même température. Le suivi analytique de l'évolution de l'état d'oxydation des échantillons est réalisé par dosage de l'indice de peroxyde tous les trois jours pendant 20 jours.

#### **Co-oxydation du système $\beta$ -carotène-acide linoléique**

Cette méthode, décrite par MARCO G.J. [9] et modifiée par MILLER H.E. [10] et PRATT D.E. [11], consiste à suivre la densité optique (à  $\lambda = 470$  nm) d'une émulsion huile/ eau constitué de  $\beta$ -carotène, d'acide linoléique, d'eau saturée en oxygène et de tween 20. En absence d'antioxydant, la densité optique diminue rapidement, alors qu'en présence d'un antioxydant, celle-ci se maintient plus ou moins longtemps. Un mélange de 0,2 mg de  $\beta$ -carotène avec 20 mg de Tween 20 est placé dans 0,5 ml de chloroforme. Le solvant est évaporé à sec sous un courant d'azote est le mélange obtenu est dilué dans 50 ml d'eau oxygénée. Une agitation vigoureuse est réalisée. L'émulsion obtenue est partagée dans des tubes à essai (bouchés et abrités de la lumière) à raison de 4 ml par tube : Dans le premier nous avons ajouté 0,2 ml de la solution d'huile essentielle (préparé dans l'éthanol à raison de 2g/l), dans le deuxième nous avons ajouté 0,2 ml de la solution de BHT (préparé dans l'éthanol à raison de 2g/l), le troisième qui servira de contrôle contient uniquement 0,2 ml d'éthanol. Un quatrième tube contenant 4 ml d'une nouvelle émulsion préparée sans  $\beta$ -carotène additionnée de 0,2 ml d'éthanol permet de régler le zéro. Les tubes à essais sont placés dans un bain marie à 50°C, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 470$  nm à la date  $t=0$ , puis toutes les 15 minutes.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Composition Chimique de l'huile essentielle de Laurier noble

19 composés sont identifiés (tableau I) soient 94,84 % de la totalité de l'huile, Les composés majoritaires sont : le linalool 10,04%, le méthyl eugénol 20,30%, l'eugénol 2,08% et l'acétate d' $\alpha$ -terpinyle 45,99 %.

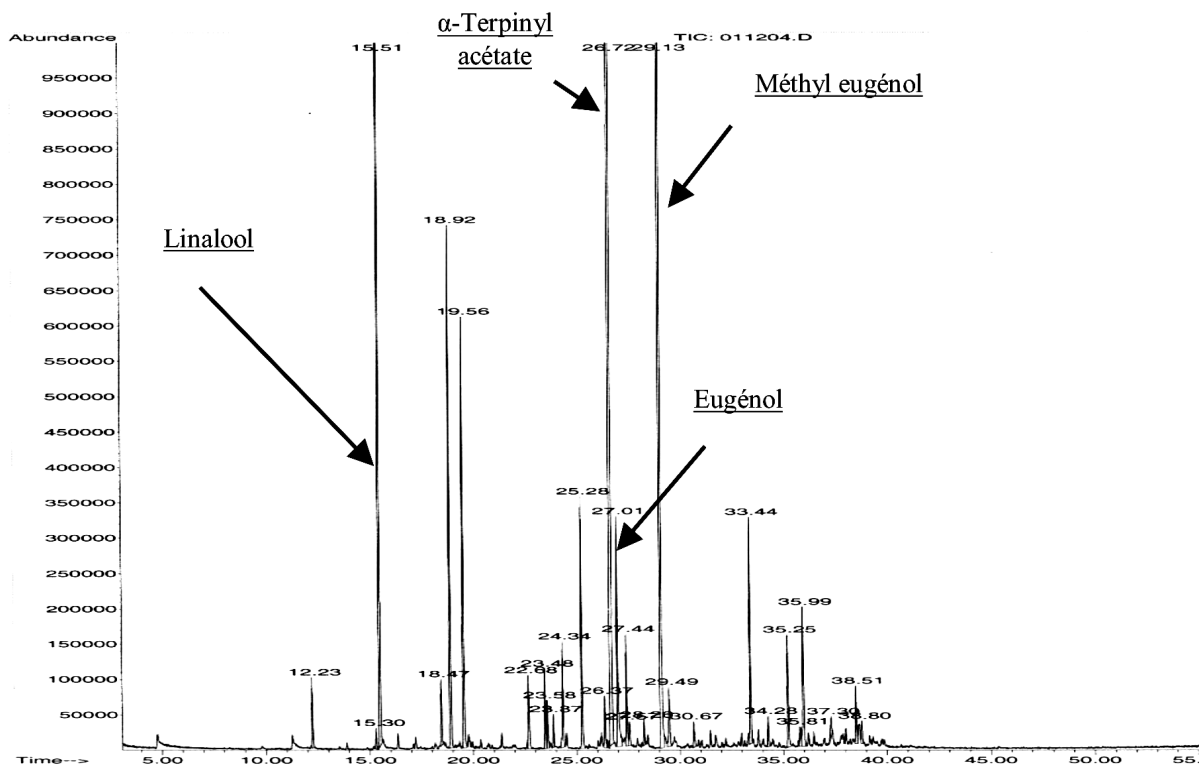


Figure 1 : Chromatogramme de l'huile essentielle des feuilles de laurier en CPG/SM

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus. Nobilis*

| Composés                       | %     | Composés               | %    |
|--------------------------------|-------|------------------------|------|
| 1,8-cinéole                    | 0,36  | Trans-caryophyllène    | 0,54 |
| Cis-sabinène hydrate           | 0,16  | Acétate de Cinnamyle   | 0,25 |
| Linalool                       | 10,04 | Elemicin               | 0,95 |
| Terpinen-4-ol                  | 4,00  | Spathulenol            | 0,19 |
| $\alpha$ -terpineol            | 3,34  | Oxyde de caryophyllène | 1,35 |
| Acétate de linalyle            | 0,71  | $\beta$ -endesmol      | 0,51 |
| Acétate de bornyle             | 0,26  |                        |      |
| Undecan-2-one                  | 0,89  |                        |      |
| $\beta$ -pinène                | 1,99  |                        |      |
| Acétate de $\alpha$ -terpinyle | 45,99 |                        |      |
| Eugénol                        | 2,08  |                        |      |
| Acétate de Neryle              | 0,93  |                        |      |
| Méthyl eugénol                 | 20,30 |                        |      |

### Etude de l'oxydation du saindoux

La figure 2 illustre la variation de l'indice de peroxyde du saindoux en fonction du temps. Quand la température s'élève, elle provoque la dégradation des composants de cette graisse animale. Ceci se traduit par une augmentation de l'indice de peroxyde comme l'indique la courbe relative au saindoux pur. L'ajout de l'antioxydant laisse l'indice de peroxyde relativement bas. Plus les valeurs qui donnent la courbe restent stables, plus l'antioxydant est efficace. Nous remarquons que les indices de peroxyde des échantillons auxquels nous avons ajouté un additif sont inférieurs à ceux du témoin : l'oxydation a été inhibée par les deux additifs utilisés. D'autre part, si on s'intéresse à l'échantillon de corps gras traité avec le BHT à la concentration de 0,02% on remarque que l'activité antioxydante du BHT à cette concentration est très peu différente de celle de l'huile essentielle à la même concentration. Pour l'échantillon traité avec l'huile essentielle à la concentration de 0,04%, on remarque que la valeur de l'indice de peroxyde augmente de nouveau à partir du 17<sup>ème</sup> jour, nous pouvons dire que probablement il y'a un effet de pro oxydation.

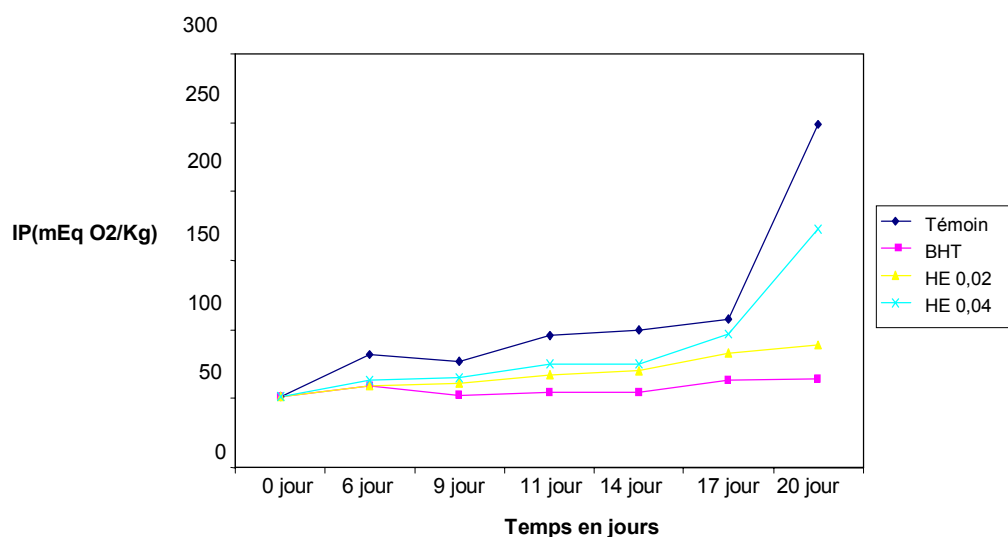


Figure 2: Variation de l'indice de peroxyde du corps gras en fonction du temps en présence d'huile essentielle de *Laurus nobilis* à différentes concentrations, comparaison avec le BHT.

### Activité antioxydante de l'huile essentielle de Laurier noble par co-oxydation du système $\beta$ -carotène-acide linoléique

La mesure de l'activité antioxydante des échantillons a été réalisée en suivant la diminution de la densité optique en fonction du temps. En effet, la décoloration de la  $\beta$ -carotène résulte du piégeage des radicaux formés au cours de l'auto oxydation de l'acide linoléique par l'oxygène, phénomène qui fait diminuer la conjugaison et, par conséquent, la densité optique de la  $\beta$ -carotène. En absence d'antioxydant, la formation des radicaux libres n'est pas limitée et la décoloration de la  $\beta$ -carotène est rapide. En revanche, sa présence bloque la formation de ces radicaux et la  $\beta$ -carotène reste inchangé. D'après les courbes (figure3) nous remarquons que les activités antioxydantes de l'huile essentielle de laurier, du BHT et d'un composé phénolique le eugénol sont comparables.

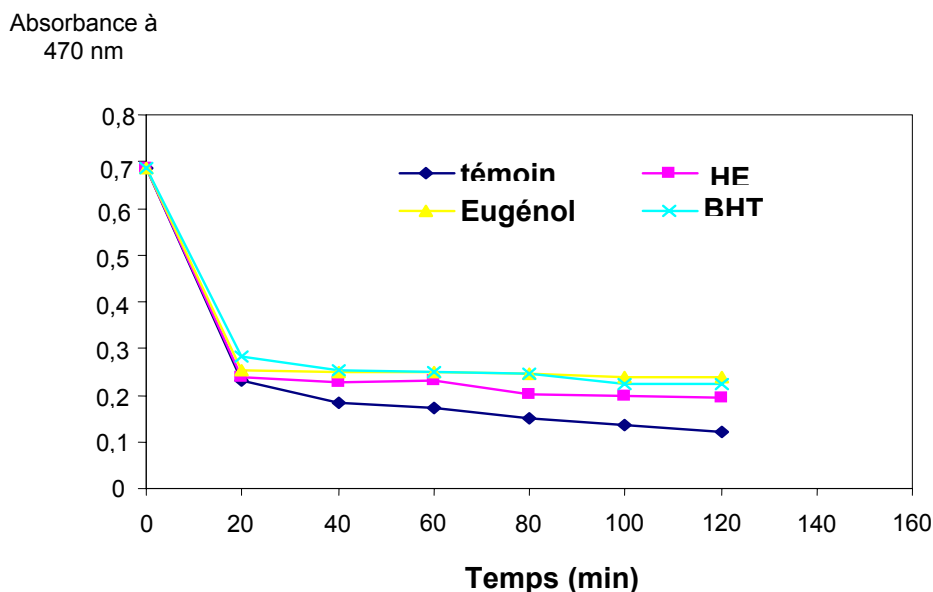


Figure 3 : Courbes de densité optique en fonction du temps, effet de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, du BHT et de l'eugénol sur la co-oxydation acide linoléique-  $\beta$ -carotène

### CONCLUSION

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de laurier noble a permis d'identifier 21 composés, ce qui correspond à 96,36% de la totalité de l'huile. Les composés majoritaires sont : le linalool 10,04%, le méthyl eugénol 20,30%, le eugénol 2,08% et l'acétate d' $\alpha$ -terpinyle 45,99%. Cette huile a manifesté une propriété antioxydante comparable à celle du BHT à la concentration de 0,02%, d'autre part la comparaison avec l'eugénol un phénol très connu pour son effet conservateur a montré que l'effet antioxydant de l'huile est comparable à celui de l'eugénol. En plus de cet effet antioxydant important, l'huile essentielle de laurier noble tunisien possède de bonnes qualités organoleptiques grâce à la présence du méthyl eugénol en concentration assez élevée. Boelens et coll. [17] ont montré qu'une huile essentielle de laurier noble contenant un pourcentage assez élevé de benzoïdes (entre 4 et 12%) a de bonnes qualités organoleptiques. La valeur obtenue pour l'huile tunisienne est de 20,30%.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] G.Pascal (1978). Rev.Fse Corps Gras, 5: 239-43.
- [2] FO.GUNSTONE, FA.NORRIS (1983). In: Lipids in Foods- Chemistry, Biochemistry and Technology, Pergamon Press, 161-5
- [3] JB.CHAZAN, M.SZULC (1987). Cah Nutr Diét, 22, 1:66-76
- [4] R.S.FARAG, A.Z.M.A.BADEI, Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic oxidation in aqueous media, J.A mer. Oil chem. Soc., 66, 792-799 (1989)
- [5] R. INATANI, N.NAKAANI, H. FUWA, Agric. Biol. Chem., 1983, 47,521
- [6] W.WUJ, N.H.LEE, O.T. HO, S.S. CHANG, J. Am. Oil Chem. Soc., 1982, 59, 339.
- [7] R.J.HRON, S.P. KOLTUN, J. POMINSKI, G. ABRAHAM, J. Am. Oil chem. Soc., 1987, 64, 1315.
- [8] T.OSAWA, N. NAMIKI, J. Agric. Food Chem., 1985, 33, 777.
- [9] G.J. MARCO, J. Am. Oil Chem. Soc., 1968, 45, 598.
- [10] H.E. MILLIER, J. Am. Oil Chem. Soc., 1971, 48, 91.
- [11] M.S.TAGA, E.E.MILLIER, D.E. PRATT, J. Am. Oil Chem. Soc., 1984, 61, 928.
- [12] S.A.Vekiari, V.Oreopoulou, C.Tzla, C.D.Thomopoulos, J. Am. Oil Chem. Soc., 1993, 70 (5), 483-487.
- [13] T.Asakawa, S.Matsushita, Lipids, 1980, 15(11), 965-967.
- [14] J.P.Wolff, Manuel d'analyse des corps gras, 1968, Azoulay, édition Paris.
- [15] T.Hirosue, H.Kawai, Y.Hosogai, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1978, 25, 691.
- [16] J.Su, T.Osawa, M.Namiki, Agric. Bia Chem., 1987, 50, 199.
- [17] H.H.Boelens, R.J.Sindreu, Progress in Essential Oil Research, Edit., E.- J. Brunke, pp 99-110, Walter de Gruyter, Berlin,1986.

# ACTIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE, ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA DE EXTRACTOS DO PIORNO DA MADEIRA

Rauter<sup>a\*</sup>, A.P.; Serralheiro<sup>a</sup>, L.; Ferreira<sup>a</sup>, J.; Martins<sup>a</sup>, A.; Justino<sup>b</sup>, J.; Silva<sup>b</sup>, F.; Goulart<sup>b</sup>, M.; Mota-Filipe<sup>c</sup>, H.

<sup>a</sup>Departamento de Química e Bioquímica/Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed. C8, 5º, 1749-016 Lisboa, Portugal Tel +351-21 750 0952

Fax +351-21 750 0088 e-mail: aprauter@fc.ul.pt

<sup>b</sup>Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém, Apartado 279, 2001-904 Santarém, Portugal Tel +351-243 307 300 Fax +351 307 301 e-mail: jorge.justino@ipsantarem.pt

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacologia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 1649-019 Lisboa, Portugal Tel +351 21 795 7458 Fax: +351 21 794 6470 e-mail:hfilipe@ff.ul.pt

**Palavras-chave:** *Genista tenera*, antioxidante, anticolinesterase, anti-hiperglicemiante

**Resumo:** Foram avaliadas as actividades antioxidante, anticolinesterásica e anti-hiperglicemiante do extracto de acetato de etilo de *Genista tenera*, uma planta cuja infusão é utilizada em medicina tradicional para combater a diabetes. A actividade antioxidante (AAT) foi determinada utilizando o método do radical DPPH, tendo conduzido a valores da ordem de 48.7% para uma concentração de extracto de 13 µg/mL. O mesmo extracto inibiu o enzima acetilcolinesterase (método colorimétrico de Ellman) em todas as concentrações testadas, atingindo uma inibição de cerca de 77% a partir da concentração 70 µg/mL. A administração intraperitoneal de 60 mg/kg/dia de extracto, durante sete dias consecutivos a ratos Whistar com diabetes induzida pela estreptozotocina, conduziu a uma diminuição da glicémia basal de cerca de 50%. Após a sobrecarga de glucose, foi observado um efeito anti-hiperglicemiante significativo ao fim de duas horas. Os resultados experimentais permitiram concluir que o extracto estudado é promissor relativamente à patologia da diabetes e à doença de Alzheimer.

## 1. INTRODUÇÃO

Os flavonóides constituem um dos maiores grupos de compostos existentes no reino vegetal, responsáveis pela coloração de muitos órgãos de plantas superiores, tornando-as atractivas para os agentes polinizadores. Para além do seu papel ecológico, estes compostos são também descritos como possuindo elevado potencial farmacológico, sendo conhecida uma grande diversidade de actividades biológicas, nomeadamente as actividades antioxidante [1] e anti-inflamatória [2]. O stress oxidativo está associado a algumas complicações secundárias da diabetes, muito em especial a nível vascular, podendo os flavonóides retardar ou mesmo impedir o desenvolvimento de tais anomalias [3]. Compostos deste tipo actuam também como agentes benéficos contra o cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas [4], pelo que o combate ao stress oxidativo através do desenvolvimento de novos princípios activos é uma das prioridades a nível da saúde pública. Os flavonóides são também considerados importantes marcadores quimiotaxonómicos em vários géneros da família das Leguminosas, nomeadamente no género *Genista*. O piorno (*Genista tenera*) é uma planta endémica da ilha da Madeira, utilizada pela população local no controlo da diabetes. O seu estudo fitoquímico revelou a presença de alcalóides [5] e de flavonóides [6-9]. A determinação da actividade anticolinesterásica destes compostos é relevante para a concepção de novos fármacos destinados ao tratamento da doença de Alzheimer, na medida em que promovem a inibição do enzima acetilcolinesterase envolvido nesta patologia.

Neste trabalho apresentam-se os resultados das actividades antioxidante, anticolinesterásica e anti-hiperglicemiante do extracto de acetato de etilo de *Genista tenera*, constituído por glicósidos de flavonóides [8].

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e extracção

A planta foi colhida na ilha da Madeira, encontrando-se depositado no Jardim Botânico da Madeira um exemplar *voucher* MADJ 2508. A parte aérea da planta seca foi moída e extraída inicialmente com etanol, sendo o extracto evaporado à secura. O resíduo obtido foi diluído em água a quente (80 °C) e extraído segundo o método de Charaux-Paris [10].

### 2.2. Actividades biológicas

A actividade antioxidante foi determinada utilizando o método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), descrito em [11]. Para a determinação da actividade anticolinesterásica recorreu-se ao método de Ellman adaptado de [12]. A actividade anti-hiperglicemiante foi determinada segundo a metodologia descrita em [13].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Actividade antioxidante

Na tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para a actividade antioxidante numa gama de concentrações entre 0,1 µg/mL e 13,0 µg/mL. Foi observada actividade antioxidante para todas as concentrações testadas, atingindo o valor máximo de 48,7% para a concentração de 13,0 µg/mL.

Tabela 1. Actividade antioxidante (AAT %) do extracto de acetato de etilo de *G. tenera*

| Concentração<br>de extracto<br>(µg/mL) | Abs.  | AAT (%) |
|--|-------|---------|
| 0,1                                    | 0,524 | 18,2    |
| 1,0                                    | 0,509 | 20,6    |
| 4,0                                    | 0,503 | 21,5    |
| 7,0                                    | 0,491 | 23,4    |
| 10,0                                   | 0,486 | 24,2    |
| 13,0                                   | 0,329 | 48,7    |

O valor de IC<sub>50</sub> é de aproximadamente 13,0 µg/mL, valor inferior ao encontrado para algumas plantas da flora portuguesa [14], o que revela uma boa capacidade antioxidante do extracto obtido a partir da planta em estudo.



### 3.2. Actividade anticolinesterásica

Os valores determinados para a inibição de acetilcolinesterase (% de inibição) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Inibição (%) de acetilcolinesterase pelo extracto de acetato de etilo de *G. tenera*

| Concentração do extracto ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Inibição de acetilcolinesterase (%) |
|---|-------------------------------------|
| 1   | 18,6                                |
| 10  | 26,8                                |
| 40  | 43,7                                |
| 70  | 76,5                                |
| 100   | 76,5                                |
| 130   | 77,0                                |

Embora se tenha observado uma percentagem de inibição com todas as concentrações testadas, verificou-se um aumento acentuado com a concentração de extracto de 70  $\mu\text{g/mL}$ , tendo-se mantido a percentagem de inibição até à concentração máxima testada de 130  $\mu\text{g/mL}$ . O  $\text{IC}_{50}$  previsto é de 65,6  $\mu\text{g/mL}$ , que demonstra uma actividade inibitória elevada face a outras plantas da flora portuguesa [14].

### 3.3. Actividade anti-hiperglicemiante

A administração de 60 mg/Kg/dia (i.p.), durante sete dias consecutivos, conduziu à diminuição significativa da glicémia basal (cerca de 50%), em ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina. Um efeito anti-hiperglicemiante significativo deste extracto foi igualmente observado duas horas após a toma de uma sobrecarga de glucose [13].

### Referências

- [1] - P. G. Pietta - *Flavonoids as antioxidants*, J. Nat. Prod. **63** (2000) 1035.
- [2] - G. Odontuya, J. R. S. Hoult, P. J. Houghton - *Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides*. Phytotherapy Res. **19** (2005) 782.
- [3] - R. F. Vitor, H. Mota-Filipe, G. Teixeira, C. Borges, A. I. Rodrigues, A. Teixeira, A. Paulo - *Flavonoids of an extract of Pterospartum tridentatum showing endothelial protection against oxidative injury*. J. Ethnopharmacol. **93** (2004) 363.
- [4] - J. P. E. Spencer, M. M. A. El-Mohsen, C. Rice-Evans - *Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity*. Arch. Biochem. Biophys. **423** (2004) 148.
- [5] - A. Martins, M. Wink, A. Tei, M. Brum-Bousquet, F. Tillequin, A.P. Rauter - *A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from Genista tenera by gas chromatography-mass spectrometry*. Phytochem. Anal. **16** (2005) 264.
- [6] - C. Borges, P. Martinho, A. Martins, A.P. Rauter, M.A. Almoester-Ferreira - *Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from Genista tenera by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry **15** (2001) 1760.
- [7] - A. Martins, M.A. Almoester-Ferreira, C. Borges, A.P. Rauter, M. Brum-Bousquet, F. Tillequin, A.G. González, J. Bermejo - *Flavonoids from Genista tenera*. In: A.P. Rauter, F.B. Palma, J.

- Justino, M.E. Araújo, S.P. Santos (eds.), Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **47** (2002) 111.
- [8] - A.P. Rauter, A. Martins, C. Borges, J. Ferreira, J. Justino, M.R. Bronze, A.B. Coelho, Y.H. Choi, R. Verpoorte - *Liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti–hyperglycemic flavonoid extract of Genista tenera. Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside.* Journal of Chromatography A **1089** (2005) 59.
- [9] - E. L. Edwards, J. A. Rodrigues, J. Ferreira, D. M. Goodall, A. P. Rauter, J. Justino, J. Thomas-Oates - *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Characterisation of Secondary Metabolites from the Anti-hyperglycaemic Plant Genista tenera*, Electrophoresis **27** (2006) 216.
- [10] - R. Paris, A. Nothis . *Plantes à dérivés polyphénoliques.* Plant. Med. Phytother. **IV** (1970) 63.
- [11] - S. K. Sadhu , E. Okuyama, H. Fujimoto, M. Ishibashi, E. Yesilada - *Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of Cistus laurifolius, a Turkish medicinal plant,* J. Ethnopharmacol. **108** (2006) 371.
- [12] - K. Ingkaninan, P. Temkitthawon, K. Chuenchom, T. Yuyaem, W. Thongnoi - *Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies.* J. Ethnopharmacol. **89** (2003) 261.
- [13] - A. Martins - *Contribuição para o estudo fitoquímico e farmacológico da flora endémica do arquipélago da Madeira: Flavonóides e alcalóides de Genista tenera.* Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, 2006.
- [14] - A.Ferreira, C.Proença, M.L.M.Serralheiro, M.E.M. Araújo - *The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal.* J. Ethnopharmacol. **108** (2006) 31-37.

# ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO

*Silva, I.\*; Rocha, S. M.; Coimbra, M.A.*

Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro

Tel +351-234 370 719 e-mail: [isilva@dq.ua.pt](mailto:isilva@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** sal marinho, composição volátil, micro-extracção em fase sólida (SPME)

**Resumo:** Com vista a avaliar a composição volátil do sal marinho da Região de Aveiro, foi desenvolvida uma metodologia de análise do espaço de cabeça utilizando a técnica de micro-extracção em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com detecção por quadrupolo (HS-SPME-GC-qMS), utilizando uma fase estacionária de carbowax divinilbenzeno com 65 µm de espessura de filme. Foram avaliadas duas formas de apresentação da amostra: o sal cristalino e uma solução aquosa saturada de sal. A análise do sal cristalino permitiu a identificação de 18 compostos, enquanto que a solução de sal saturada permitiu a identificação de 30 compostos, com uma área cromatográfica total superior em cerca de 43% em relação ao sal cristalino, para o mesmo volume de fase de vapor. Entre os compostos identificados foram encontrados compostos terpénicos e compostos resultantes da degradação de carotenóides, como a β-ionona e a di-hidroactinidiolida, provenientes de algas marinhas. Encontraram-se também compostos que poderão ter origem na comunidade bacteriana das salinas, como o n-heptadecano e o 8-heptadeceno.

## 1. INTRODUÇÃO

A micro-extracção em fase sólida (SPME) foi introduzida no final dos anos 80 para análise de poluentes em água [1]. Apresentou-se como uma alternativa aos métodos de extracção em espaço de cabeça dinâmico, extracção líquido-líquido e outras técnicas de extracção [2]. Trata-se de uma técnica de extracção e pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, sem uso de solventes. Envolve a exposição de uma fase estacionária à amostra e a partição dos analitos entre fases (fase estacionária e fase de vapor e/ou fase líquida e/ou fase sólida). Posteriormente, os compostos sorvidos podem ser termicamente desorvidos no injector de um cromatógrafo em fase gasosa (GC) [3]. A sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de SPME dependem de parâmetros experimentais, tais como a temperatura e o tempo de extracção, o efeito “salting out”, o volume e o modo de apresentação da amostra [3, 4]. O efeito “salting out” observa-se quando a presença de um sal em solução diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa, promovendo a sua passagem para a fase de vapor [4].

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de análise da composição volátil do sal marinho utilizando a técnica de SPME e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS). Foram avaliadas duas formas de apresentação da amostra: o sal cristalino e uma solução aquosa saturada de sal.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Foram analisadas amostras de sal marinho de Aveiro provenientes da marinha “Peijota”, da colheita de 2005, situada no grupo sul do salgado de Aveiro.

Na análise da composição volátil do sal marinho usou-se como fase estacionária da fibra de SPME a carbowax divinilbenzeno com 65  $\mu\text{m}$  de espessura, indicada para a extracção de compostos polares.

### 2.2 Análise da composição volátil do sal cristalino

Cerca de 35 g (40 mL) de sal cristalino (razão  $1/\beta = 0,5$ ) foi colocado num frasco de 120 mL, o qual permaneceu fechado durante 18 h, num banho termostaticado a 60°C. Após este período a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 minutos. De seguida procedeu-se à separação e identificação dos compostos sorvidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com detecção por quadrupolo (GC-qMS). Foram realizados 3 ensaios.

### 2.3 Análise da composição volátil da solução aquosa saturada de sal

Colocou-se num frasco de 120 mL cerca de 16 g de amostra de sal e água ultra-pura<sup>1</sup> até se atingir um volume de 40 mL de solução (razão  $1/\beta = 0,5$ ), o frasco permaneceu fechado durante 18 h num banho termostaticado a 60°C, sob agitação a 500 r.p.m. com um ímã de 30 mm. Após este período a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 minutos. De seguida procedeu-se à separação e identificação dos compostos sorvidos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com detecção por quadrupolo (GC-qMS). Foram realizados 3 ensaios.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

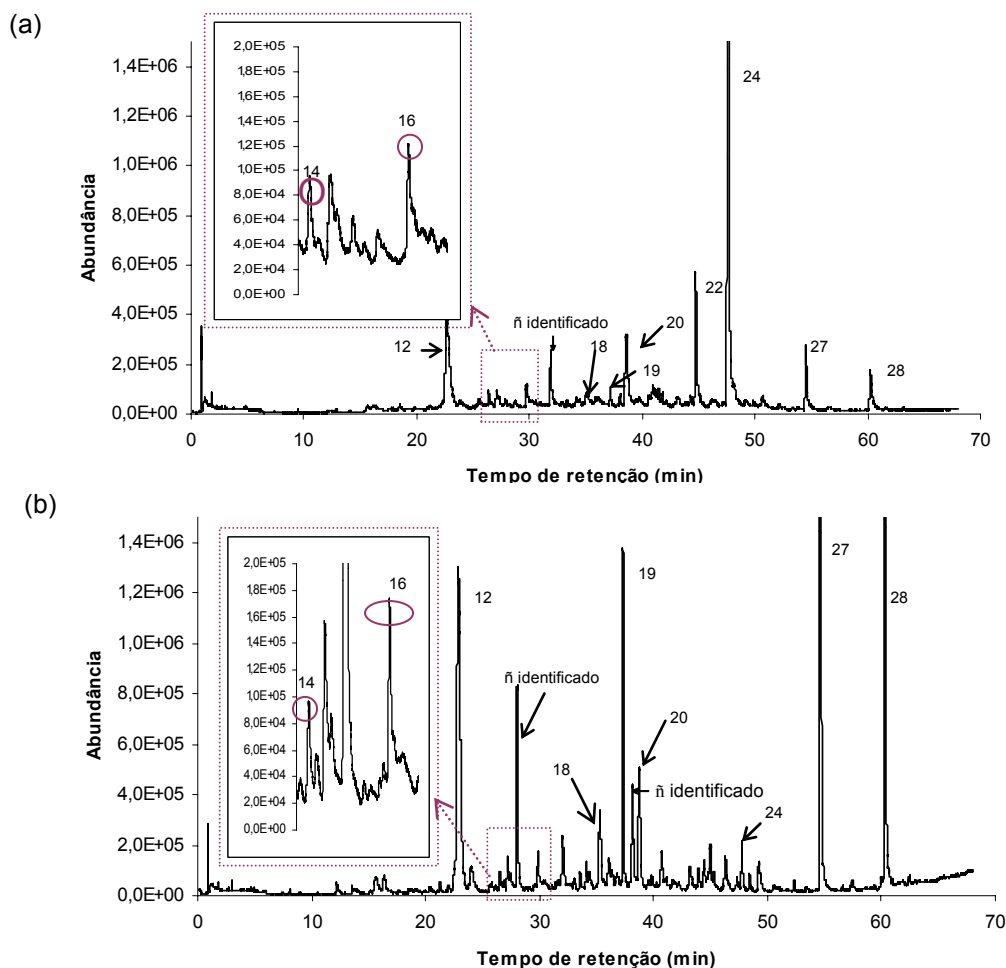
O estudo do efeito do modo de apresentação da amostra na análise da composição volátil do sal por SPME-GC-MS deu origem aos resultados apresentados na tabela 1. Foram identificados no sal marinho de Aveiro da marinha Peijota, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, tioéteres, compostos terpénicos e norisoprenóides. Os álcoois e os compostos terpénicos só foram identificados na análise da solução aquosa saturada de sal, na qual foram identificados 30 compostos, enquanto que os tioéteres só foram identificados na análise ao sal cristalino cujo número de compostos identificados foi de 18. A razão para que haja um maior número de compostos identificados na análise da solução aquosa saturada de sal poderá estar relacionada com a possibilidade de no sal cristalino parte destes se encontrarem adsorvidos à superfície dos cristais de sal ou aprisionados no seu interior. A hidratação e dissolução do sal permitem que estes se libertem.

A área cromatográfica total foi superior cerca de 43% para a análise da solução aquosa saturada de sal.

---

<sup>1</sup> Água bi-distilada que foi passada primeiro por um filtro de carvão activado, depois por um filtro de iões e por fim foi ultra-filtrada por um filtro de 0,01  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

Na figura 1 estão representados os cromatogramas destas análises, onde estão evidenciados os picos mais intensos assim como os da  $\alpha$  e  $\beta$ -ionona.



**Figura 1** – (a) Cromatograma do sal cristalino (b) Cromatograma da solução aquosa saturada de sal.

Os compostos identificados no sal marinho analisado parecem ter basicamente 3 origens: i) algas marinhas, ii) comunidade bacteriana envolvente e iii) poluição do meio.

As algas e bactérias possuem pigmentos naturais, os carotenóides, que podem sofrer degradação originando norisoprenóides [5]. Os compostos 6-metil-5-hepteno-2-ona, 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona, 6-metil-2-heptanona, di-hidroactinidiolida, geranyl acetona,  $\beta$ -ionona e  $\alpha$ -ionona já foram identificados em diversos estudos como sendo derivados da degradação dos carotenóides [5, 6, 7].

O 8-heptadeceno e o *n*-heptadecano foram identificados em plantas aquáticas e em comunidades bacterianas próprias de ambientes hipersalinos [8, 9].

Compostos considerados poluentes poderão ter origem na contaminação da água que abastece as marinhas, na atmosfera envolvente ou no material usado para armazenar o sal. Os ftalatos, são compostos orgânicos semi-voláteis usados como substância plastificante e como emulsionantes [10].

**Tabela 1** – Compostos voláteis e semi-voláteis identificados no sal cristalino e na solução aquosa saturada de sal; compostos organizados por grupos químicos.

| Pico nº                                       | COMPOSTOS  | ID <sup>a</sup> | Áreas cromatográficas (×10 <sup>-6</sup> ) |             |                         |             |
|---|--|-----------------|--|-------------|-------------------------|-------------|
|   |  |                 | Sal cristalino                             |             | Solução aquosa saturada |             |
|   |  |                 | Média                                      | (CV)        | Média                   | (CV)        |
| <b>Hidrocarbonetos</b>                        |  |                 |  |             |                         |             |
| 8   | Pentadecano  | B               | -  | -           | 21,81                   | (44)        |
| 11  | Heptadecano  | B               | -  | -           | 11,95                   | (25)        |
| 12  | 8-Heptadeceno  | B               | 81,86                                      | (9)         | 336,93                  | (26)        |
| 13  | Heptadecadieno   | B               | -  | -           | 17,96                   | (19)        |
| <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>         |  |                 | <b>81,86</b>                               | <b>(9)</b>  | <b>388,65</b>           | <b>(24)</b> |
| <b>Subtotal (%)</b>                           |  |                 | <b>6</b>                                   |             | <b>21</b>               |             |
| <b>Alcoois</b>                                |  |                 |  |             |                         |             |
| 7   | 2-Etil-1-hexanol   | B, P            | -  | -           | 1,42                    | (25)        |
| 17  | 2-Metil-1-dodecano   | B               | -  | -           | 4,33                    | (43)        |
| <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>         |  |                 | <b>0,00</b>                                |             | <b>5,74</b>             | <b>(26)</b> |
| <b>Subtotal (%)</b>                           |  |                 | <b>0</b>                                   |             | <b>0</b>                |             |
| <b>Aldeídos e Cetonas</b>                     |  |                 |  |             |                         |             |
| 9   | β-Ciclocitral  | B               | 2,90                                       | (6)         | -                       | -           |
| 23  | α-Hexil-cinamaldeído   | B               | 6,45                                       | (33)        | 4,41                    | (32)        |
| 2   | 6-Metil-2-heptanona  | B, P            | 0,26                                       | (23)        | 0,32                    | (27)        |
| 4   | 2,2,6-Trimetil-Ciclohexanona   | B               | 0,26                                       | (6)         | 0,24                    | (45)        |
| 5   | 6-Metil-5-hepteno-2-ona  | B, P            | -  | -           | 0,51                    | (59)        |
| 10  | 6,10-Dimetil-2-undecanona  | B               | 1,90                                       | (28)        | 3,66                    | (9)         |
| 19  | 2,6-di( <i>t</i> -Butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclohexadieno-1-ona  | B               | 9,57                                       | (53)        | 38,65                   | (114)       |
| 20  | 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona                                     | B               | 35,77                                      | (33)        | 42,25                   | (28)        |
| 22  | Di-hidroactinidolida   | B               | 58,69                                      | (12)        | -                       | -           |
| 25  | 1-(3-Etil-5,6,7,8-tetraidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil) etanona | B               | 3,76                                       | (39)        | 3,24                    | (69)        |
| <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>         |  |                 | <b>117,68</b>                              | <b>(4)</b>  | <b>100,83</b>           | <b>(60)</b> |
| <b>Subtotal (%)</b>                           |  |                 | <b>9</b>                                   |             | <b>5</b>                |             |
| <b>Ésteres e Tioéteres</b>                    |  |                 |  |             |                         |             |
| 18  | Miristato de isopropilo  | B               | 20,75                                      | (64)        | 27,30                   | (63)        |
| 21  | Diidro metil jasmonato   | B               | 9,34                                       | (60)        | 7,68                    | (59)        |
| 24  | Ftalato de etilo   | B               | 161,57                                     | (134)       | 10,10                   | (58)        |
| 27  | Ftalato de isobutilo   | B               | -  | -           | 179,39                  | (79)        |
| 28  | Ftalato de butilo  | B               | 36,03                                      | (45)        | 108,11                  | (77)        |
| 6   | 2,3,4-Tritiapentano  | B               | 0,31                                       | -           | -                       | -           |
| <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>         |  |                 | <b>227,79</b>                              | <b>(85)</b> | <b>332,59</b>           | <b>(76)</b> |
| <b>Subtotal (%)</b>                           |  |                 | <b>17</b>                                  |             | <b>18</b>               |             |
| <b>Compostos terpênicos e norisoprenóides</b> |  |                 |  |             |                         |             |
| 1   | 1,8-Cineol   | B, P            | -  | -           | 0,34                    | -           |
| 3   | <i>p</i> -Cimeno   | B, P            | -  | -           | 1,54                    | (24)        |
| 14  | α-Ionona   | B, P            | 6,51                                       | (18)        | 5,76                    | (6)         |
| 15  | Geranil acetona  | B, P            | -  | -           | 14,82                   | (18)        |
| 16  | β-Ionona   | B, P            | 18,04                                      | (50)        | 12,65                   | (6)         |
| 26  | 4-Oxo-β-ionona   | B               | 4,13                                       | (12)        | -                       | -           |
| <b>Subtotal (área cromatográfica)</b>         |  |                 | <b>28,68</b>                               | <b>(31)</b> | <b>34,88</b>            | <b>(10)</b> |
| <b>Subtotal (%)</b>                           |  |                 | <b>2</b>                                   |             | <b>2</b>                |             |
| <b>Totais</b>                                 |  |                 | <b>1303,26</b>                             | <b>(12)</b> | <b>1860,51</b>          | <b>(34)</b> |

<sup>a</sup> B - Identificação pelo espectro de massa proposto pela base de dados Wiley 275

P - Confirmação do tempo de retenção pelo espectro de massa do padrão puro

#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que o sal marinho possui por si só compostos voláteis que poderão modular o aroma dos alimentos, o qual poderá ser potenciado pela dissolução do sal e libertação dos compostos voláteis incluídos na malha cristalina. Os compostos identificados parecem ter basicamente 3 origens: i) algas marinhas, ii) comunidade bacteriana envolvente e iii) poluição do meio.

#### Referências

- [1] - Belardi, R.; Pawliszyn, J. (1989) *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24, 179-191; [2] - Arthur, C.; Pawliszyn, J. (1990) *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148; [3] - Arthur, C. L.; Killam, L. M.; Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. (1992) *Anal. Chem.*, 64, 1960-1966; [4] - Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. (2001) *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5142-5151; [5] - Winterhalter, P.; Rouseff, R.L. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction, American Chemical Society, 2002; [6] - Zeb, A.; Mehmood, S. (2004), *Pakistan J. Nutr.*, 3, 199-204; [7] - Kamenarska, Z.; Gasic, M.J.; Zlatovic, M.; Rasovic, A.; Sladic, D.; Kljajic, Z.; Stefanov, K.; Seizova, K.; Najdenski, H.; Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Popov, S. (2002), *Bot. Mar.*, 45, 339-345; [8] - Fourçans, A.; Oteyza, T.; Wieland, A.; Solé, A.; Diestra, E.; Bleijswijk, J.; Grimalt, J.; Kühl, M.; Esteve, I.; Muyzer, G.; Caumette, P.; Duran, R. (2004) *FEMS Microbiol. Ecol.*, 51, 55-70; [9] - Qiming, X.; Haidong, C.; Huixian, Z.; Daqiang, Y. (2006) *Flavour and Fragr. J.*, 21, 524-526; [10] - Saito, I.; Onuki, A.; Seto, H. (2004) *Indoor Air*, 14, 325-332.

# ANÁLISES POR HS-SPME-GC E HS-SPME-GC-MS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS *Calamintha baetica*, *Thymus mastichina* E *Origanum vulgare* EM DIFERENTES EMBALAGENS

Bento, F.<sup>1</sup>; Gonçalves, V.<sup>1</sup>; Cavaco, T.<sup>1</sup>; Almeida, V.<sup>1,2</sup>; Costa, M.<sup>3</sup>; Galego, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Tecnologia, Área Departamental de Engenharia Alimentar - Universidade do Algarve - Campus da Penha, 8005-139 FARO; Tel: +351 289 800 151 Fax 351 289 888 405 e-mails:

[fbento@ualg.pt](mailto:fbento@ualg.pt); [vgoncalves@ualg.pt](mailto:vgoncalves@ualg.pt); [tcavaco@ualg.pt](mailto:tcavaco@ualg.pt); [valmeida@ualg.pt](mailto:valmeida@ualg.pt); [lgalego@ualg.pt](mailto:lgalego@ualg.pt)

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica - Quinta do Marquês – Apartado 127  
2780-505 OEIRAS; Tel: + 351 214 469 800, Fax: + 351 214 428 766

<sup>3</sup>Direcção Regional de Agricultura do Algarve - Apartado 282, Braciais – Patação  
8001-904 FARO Tel: + 351 289 870 700; Fax: 289 816 003; [flores@draalg.min-agricultura.pt](mailto:flores@draalg.min-agricultura.pt);

**Palavras-chave:** voláteis, embalagem, *Calamintha*, *Thymus*, *Origanum*

**RESUMO:** As plantas aromáticas têm sido usadas desde há muitos séculos, com fins alimentares, cosmética e medicinais. No entanto, não se encontram muitos estudos sobre a melhor forma de as conservar. O presente trabalho refere-se à análise de compostos voláteis de *Calamintha baetica*, *Thymus mastichina* and *Origanum vulgare*, produzidas no campo experimental da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (DRAALG) em 2005 e 2006.

As plantas foram analisadas após secagem e depois de 6 e 12 meses em embalagens de vidro, de polietileno de baixa densidade, de polipropileno, de tecido de algodão e de papel *craft*. Os compostos voláteis foram estudados no espaço de cabeça de *vials* de 20 ml contendo 0,5 g de planta, após 20 minutos de exposição à temperatura do laboratório ( $20 \pm 2$  °C). As análises foram feitas por GC ou por GC-MS.

Em todas as embalagens existe uma tendência para diminuir a percentagem dos compostos mais voláteis e um conseqüente aumento das percentagens dos menos voláteis. Contudo o vidro é a embalagem que apresentam menores diferenças percentuais entre todos os compostos analisados para os 6 meses e 1 ano de armazenamento.

## 1 – INTRODUÇÃO

O uso das plantas aromáticas no Algarve começou antes na nossa era, já Gregos e Romanos preparavam na região o *garum* também conhecido por *salsamen*, uma espécie de conserva à base de marisco e peixe triturado, temperado com sal, azeite e plantas aromáticas, que era exportado para vários países do mediterrânico [1]. Alguns séculos mais tarde (713 – 1249) os árabes também usaram e difundiram várias plantas aromáticas além de implementaram técnicas de extracção de óleos essenciais dessas plantas nos lagares de azeite [2]. Com mais ou menos inovações as plantas aromáticas continuam a ser usadas na Alimentação tradicional dos Algarvios, quer em fresco quer depois de secadas. Este trabalho tem por objectivo estudar a evolução dos principais compostos aromáticos durante o armazenamento em 5 embalagens diferentes e durante vários meses de armazenamento.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Plantas

As plantas usadas cresceram num campo experimental da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (DRAALG). De cada tipo de planta em estudo existem 3 blocos de 25 plantas, cada. Depois da floração, as plantas foram cortadas e secas num secador solar com condições controladas. Algumas amostras foram analisadas após a secagem, outras foram guardadas em embalagens de 5 materiais diferentes: vidro, polietileno de baixa densidade, polipropileno,

algodão e papel *craft*. As análises às amostras embaladas foram efectuadas após 6 meses e após 1 ano.

## 2.2 - Extracção por micro extracção em fase sólida

Uma fibra de 65  $\mu\text{m}$  de revestimento polimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) é exposta durante 20 min no espaço de cabeça da vial de 20 ml contendo 0,5 g de planta seca. A extracção decorre à temperatura do laboratório ( $20 \pm 2$  °C). Depois a fibra é recolhida e transferida para o injector de um cromatografia gasoso munido de um detector FID ou num MS, onde permanente pelo menos 5 minutos.

## 2.3 - Análises por GC-MS

Foi usado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 17-A equipado com um detector de massa Shimadzu QP-5000. A separação foi feita com o auxílio de uma coluna J&W Scientific DB-1701P com 30 m x 0,25 mm com 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme. A programação de temperatura do forno do cromatógrafo foi 40 °C durante 5 min, depois um aumento até 230 °C a uma taxa de 5 °C/min e finalmente 5 min a 230 °C. O gás de arraste foi o hélio a uma pressão de  $1,4 \times 10^5$  Pa.

Os espectros de massa são obtidos por impacto electrónico (EI) a 70 eV, com varrimentos de m/z 30 a 300. A temperatura da interface foi de 250 °C. A aquisição de dados foi efectuada usando o *software* Class5K.

A identificação e/ou as tentativas de identificação foram feitas recorrendo à análise da corrente iónica total (TIC) ou recorrendo à análise de correntes de iões seleccionados (MIC) e usando as bibliotecas de espectros do NIST12 ou NIST62 (National Institute of Standards and Technology) e Wiley 229. Quando possível a identificação foi confirmada com o auxílio de padrões

## 2.4 – Análise por GC

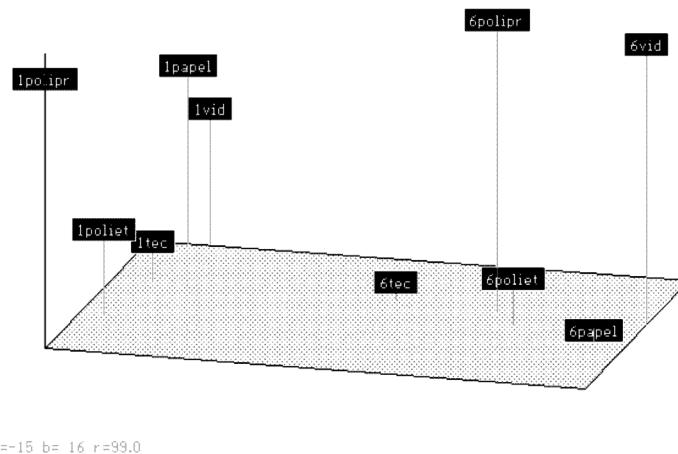
A análise por cromatografia gasosa foi efectuada usando um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890 Série II equipado com detector FID. O gás de arraste foi o hélio. Os compostos foram separados numa coluna de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme DB-1701P da J & W Scientific. A temperatura do injector foi 250 °C no modo split (split, 1:30). A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C durante 5 minutos; seguido de um aumento a uma taxa de 5 °C/min até 210 °C, temperatura onde permaneceu por 5 minutos. A temperatura do Detector FID foi de 270 °C. A aquisição de dados foi efectuada recorrendo ao *software* Chromulan

## 3 - RESULTADOS

Pode verificar-se, figura 1, que após 1 ano de armazenamento existe uma maior variação dos compostos voláteis na espécie *Origanum vulgare*, comparativamente com *Calamintha baetica*, *Thymus mastichina*, em qualquer das embalagens em estudo.







**Figura 3** – Representação das três primeiras componentes principais para os objectos estudados de *Origanum vulgare*; com a amostragem dos 6 meses e 1 ano nos 5 tipos diferentes de embalagem).

Todos os dados cromatográficos foram analisados pelo software NTSYS.

Este estudo ainda não se encontra concluído pois será necessário continuar por mais 12 meses como inicialmente previsto.

#### Referências

- [1] Silva, J.B.P., Loulé Memórias e identidade..., héstia editores, (2003), 120.
- [2] Nunes M.C.V.C.T. Breve Perspectiva da industria e Comercio Muçulmanos na Península Hispânica e suas influências na vida sócio-económica do Algarve, Actas do 4º Congresso do Algarve, Racal Clube, Vol I, (1986),103-109.

#### Agradecimentos:

Agradece-se o apoio financeiro do Projecto AGRO 800.

# APLICAÇÃO DA DETECÇÃO ELECTRÓNICA DE AROMAS NA CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES DE AGRICULTURA BIOLÓGICA

*Pintado, C.J.M.<sup>1</sup>, Peres, M.F.<sup>2</sup>, Peres, C.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Olivicultura, Estação Nacional de Melhoramento de Plantas  
Apartado 6, 7350-951 Elvas, Portugal  
Tel +351-268 637 450 Fax +351-268 637 458 e-mail: [pintado.cristina@gmail.com](mailto:pintado.cristina@gmail.com)

<sup>2</sup>Escola Superior Agrária  
Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, Portugal,  
Tel +351-272 339 939 Fax +351-272 339 901 e-mail: [fperes@esa.ipcb.pt](mailto:fperes@esa.ipcb.pt)

**Palavras-chave:** nariz electrónico, azeite monovarietal, cultivar Galega, índice de maturação

**Resumo:** A detecção electrónica de aromas tem tido grande desenvolvimento nos últimos anos para obviar algumas dificuldades inerentes à avaliação sensorial de alimentos. O presente trabalho aplica esta metodologia para caracterização de azeites da cultivar Galega vulgar, extraídos em equipamento OLIOMIO a partir de colheitas seleccionadas durante as campanhas de 2004/05 e 2005/06, em olivais em modo de produção biológico na Região da Beira Baixa. Para o efeito utilizou-se um equipamento FOX 2000 da Alpha M.O.S. Apresentam-se os resultados obtidos em azeites provenientes de agricultura biológica e faz-se uma comparação com amostras provenientes de outros modos de produção.

## 1. INTRODUÇÃO

As características organolépticas do azeite virgem são um parâmetro de importante valor comercial. O actual regulamento comunitário<sup>1</sup> estabelece a necessidade de ausência de defeitos e presença de frutado para que a classificação do azeite seja na categoria mais valorizada - a de “azeite virgem extra”. A avaliação sensorial do azeite virgem necessita de um painel de provadores, devidamente seleccionado e treinado, o que torna a análise lenta e dispendiosa.

Para obviar algumas dificuldades inerentes à avaliação sensorial têm sido desenvolvidas metodologias instrumentais para a caracterização organoléptica especialmente no que concerne ao aroma e ao sabor. Na detecção electrónica de aromas analisa-se o “espaço de cabeça” das amostras mediante um sistema de sensores e, posteriormente, através de tratamento quimiométrico dos dados obtém-se informação estatística sobre a semelhança/diferença entre as amostras.

Em azeite, a detecção electrónica de aromas tem sido aplicada na classificação do produto segundo a qualidade<sup>2-5</sup>, a cultivar<sup>4-6</sup> e a proveniência geográfica<sup>4,7</sup>, na pesquisa de fraudes<sup>8</sup> e no estudo de alterações do produto durante a “vida útil”<sup>9</sup>.

O presente trabalho aplica a detecção electrónica de aromas à caracterização de azeites monovarietais de ‘Galega vulgar’ provenientes de olivais de produção biológica e, paralelamente, apresenta-se uma comparação com azeites de produção integrada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

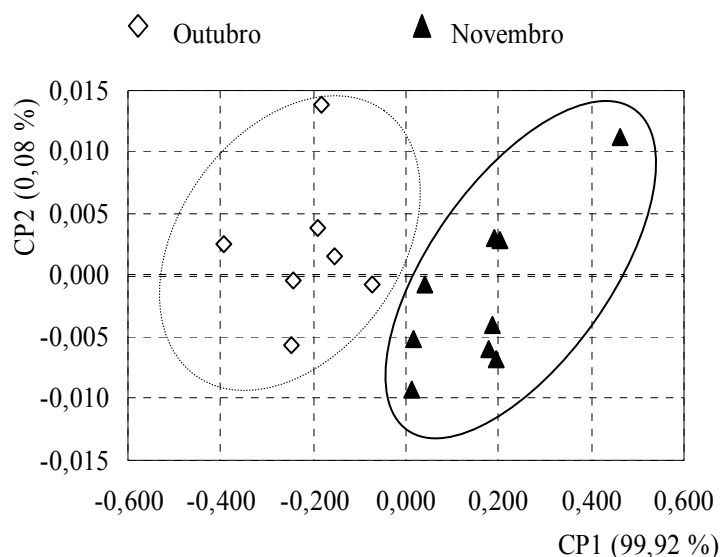
Nas campanhas 2004/05 e 2005/06 colheram-se frutos de *Olea europaea* L. cv. Galega vulgar em olivais situados na Beira Baixa em modos de produção biológica e integrada. A colheita processou-se na segunda quinzena de Outubro e de Novembro. O índice de maturação foi determinado com base na coloração dos frutos<sup>10</sup>. Procedeu-se à extracção do azeite com o sistema de duas fases (OLIOMIO 50).

A detecção de aromas efectuou-se no equipamento FOX 2000 da Alpha M. O. S. (Multi Organoleptic Systems) munido dos sensores de óxidos metálicos P10/1, P10/2, P40/1, T30/1, T70/2 e PA2 segundo metodologia anteriormente descrita<sup>11</sup>. O tratamento estatístico dos dados consistiu na Análise de Componentes Principais efectuada através do programa Alpha Soft versão 8.01.

O exame organoléptico foi realizado por painel de provadores<sup>12</sup>.

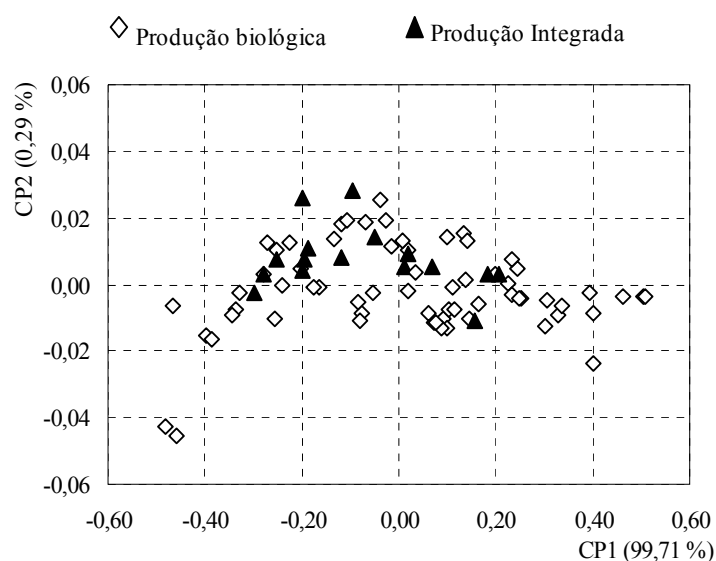
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de componentes principais dos resultados da detecção electrónica de aromas permite separar os grupos de azeites da primeira e segunda datas de colheita (Figura 1), correspondentes a azeites extraídos de frutos caracterizados por valores médios do índice de maturação de 4,6 e 5,3, respectivamente. Em termos sensoriais, os azeites obtidos das colheitas de Outubro e Novembro revelaram diferenças significativas relativamente às características gustativas, sendo mais amargos os de Outubro e mais doces os de Novembro.



**Figura 1** – Detecção electrónica de aromas em azeites de frutos colhidos em meados de Outubro e meados de Novembro em olivais em modo de produção biológico. Análise de componentes principais.

No entanto, esta técnica não distinguiu azeites de diferentes modos de produção, extraídos de azeitonas com índices de maturação muito idênticos, da mesma cultivar e da mesma proveniência geográfica (Figura 2).



**Figura 2** – Detecção electrónica de aromas em azeites provenientes de frutos de olivais em modo de produção biológico e modo de produção integrada. Análise de componentes principais.

#### 4. CONCLUSÕES

A detecção electrónica apresentou potencial para distinguir azeites ‘Galega vulgar’ extraídos de frutos com índices de maturação diferentes provenientes de olivais em modo de produção biológica. Esta metodologia instrumental não separou os azeites provenientes de olivais em modo de produção biológica e integrada.

#### Referências

- [1] – Regulamento (CE) nº 1989/03.
- [2] – Y.G. Martín, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, C.G. Pinto - *Anal. Chim. Acta* **384** (1999) 83.
- [3] – Y.G. Martín, M.C.C. Oliveros, J.L.P. Pavón, C.G. Pinto, B.M. Cordero - *Anal. Chim. Acta* **449** (2001) 69.
- [4] - A. Guadarrama, M.L. Rodríguez-Méndez, C. Sanz, J.L. Ríos, J.A. de Saja - *Anal. Chim. Acta* **432** (2001) 287.
- [5] - A.B.N. Cruz, A.M.C. Freitas, J.M.B. Gouveia - *Rev. Ciências Agrárias* **1-2-3 e 4** (1998) 295.
- [6] – I. Marcos Lorenzo, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, C. Garcia Pinto, B. Moreno Cordero, L.R. Henriques, M.F. Peres, M.P. Simões, M.C. Pinheiro-Alves - *Anal Bional Chem*, **374** (2002) 1205.
- [7] – D. Ballabio, M.S. Cosio., S. Mannino, R Todeschini - *Anal. Chim. Acta* **578** (2006) 170.
- [8] – M.C.C. Oliveros, J.L.P. Pavón, C.G. Pinto, M.E.F. Laespada, B.M. Cordero, M. Forina - *Anal. Chim. Acta* **459** (2002) 219.
- [9] – M.S. Cosio, D. Ballabio, S. Benedetti, C. Gigliotti - *Food Chem.* **101** (2007) 485.
- [10] – D. Barranco, D. Fernandez-Escobar, L. Rallo (eds.) – *El cultivo del olivo*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (1997).
- [11] – P. Simões-Lopes, J.B. Gouveia, M.F. Peres, C. Gouveia, L.R, Henriques, M.C. Pinheiro-Alves, A.M. Freitas - *Melhoramento* **41** (2006) 210.
- [12] – Regulamento (CE) nº 2568/91.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto Agro 463 - Acção 8.1, Medida 8 do Programa AGRO.



# CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE QUEIJO SERPA

Canada, J.\*, Gonzalez, C.G.\*\*\*, Ventanas, J.\*\*

\* Área Departamental de Tecnologia de Alimentos, Escola Superior Agrária de Beja, Portugal  
.tel+351284314300 E-mail joao.canada@esab.ipbeja.pt

\*\* Departamento de Higiene e Tecnologia de Alimentos, Facultad de Veterinária, Univeridad de Extremadura, Cáceres, España

**Palavras Chave:** DOP, Nariz Electrónico, Queijo Serpa, análise sensorial, qualidade, certificação.

## 1. RESUMO

O Queijo Serpa é um queijo tradicional, elaborado com leite cru de ovelha, coagulado com cardo (*Cynara*, spp) e produzido no Baixo Alentejo. Desde 1987 está protegido com a Denominação de Origem Queijo Serpa e existem referências históricas destas produções de leite e queijo desde o século XVI.

O objectivo deste trabalho foi efectuar a caracterização sensorial de Queijo Serpa e analisar a utilidade de um Nariz Electrónico (NE), equipamento AromaScan, para avaliar as características deste queijo. O estudo foi efectuado com 73 queijos produzidos em 2 diferentes épocas do ano, Inverno e na Primavera e recolhidos em 4 “rouparias” a elaborar Queijo Serpa certificado.

A avaliação sensorial mostrou a existência de diferenças significativas em sabor e fleivor dos 2 lotes de queijos produzidos no Inverno e na Primavera, que apresentaram também uma textura mais cremosa e um sabor mais intenso na Primavera.

O cheiro e fleivor também se revelaram mais intensos e mais agradáveis na Primavera, assim como no queijo com maior duração de cura.

As correlações obtidas entre a avaliação sensorial efectuada por um painel de provadores qualificado e as registadas pelo NE, mostram que este equipamento é eficiente na identificação dos 2 lotes de Queijo Serpa avaliados.

## 2. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade que na região do Alentejo é tradicional a produção de queijo de ovelha elaborado de forma artesanal e semelhante à utilizada na região da Serra da Estrela, sendo esta tecnologia introduzida provavelmente pelos pastores da Serra na transumância. O Queijo Serpa produz-se no sul de Portugal em toda a Região do Baixo Alentejo mas com maior incidência na zona interior sul desta província e a zona de maior tradição de produção localizava-se nos concelhos de Beja e Serpa sendo quase todos os “roupeiros” originários de povoações dos arredores de Beja, Penedo Gordo e Boa Vista (Santa Clara do Louredo) [1].

A DOP Queijo Serpa é a mais antiga do Alentejo e foi criada pela Portaria nº 252/91 de 26 de Março, que estabelece as normas para protecção da produção na região do Queijo Serpa, feito com cardo e leite cru de ovelha proveniente de rebanhos com garantia sanitária e explorados na região ) [2].[3].

O Queijo Serpa define-se como queijo curado, de pasta semi mole, amanteigada, com poucos ou nenhuns olhos, obtido por dessoramento lento da coalhada depois da coagulação do leite cru de ovelha por actuação de uma infusão de cardo (*Cynara cardunculus* L.) e proveniente da Área Geográfica de Produção (Decreto Regulamentar Nº 39/87) que engloba uma grande parte da região do Baixo Alentejo. [4].

Nos últimos anos foram desenvolvidos numerosos trabalhos sobre avaliação sensorial de queijos de pasta prensada. Os guias de avaliação desenvolvidos para a análise olfato-gustativo assim como para análise de textura de queijos de vaca e de ovelha, são instrumentos de trabalho muito úteis para quem se queira iniciar na análise sensorial de este tipo de queijos [5].

Em Portugal Freitas *et al.* (2000) [6] efectuaram uma revisão sobre os aspectos tecnológicos e sensoriais de queijos com denominação de origem (DOP) elaborados na Península Ibérica com leite de ovelha, de cabra e de mistura de ambas. Estes queijos, procedentes de Portugal e Espanha, se dividem em quatro grupos diferentes em função do tipo de leite e de coalho: (i) Azeitão, Castelo Branco, Évora, Nisa, Serpa, Serra da Estrela e La Serena, que se preparam com leite de ovelha e coalho de origem vegetal; (ii) Terrincho, Idiazabal, Manchego, Roncal e Zamorano, elaborados com leite de ovelha e coalho animal; (iii) Cabra Transmontano e Majorero, obtidos a partir de leite de cabra e coalho de origem animal; e (iv) Amarelo da Beira Baixa, Picante da Beira Baixa e Rabaçal, elaborados com leite de ovelha e de cabra e com coalho de origem animal. Existem diferenças consideráveis entre os queijos portugueses e espanhóis com denominação de origem, os primeiros têm, em geral, uma consistência mais suave e possuem características muito similares em quanto à sua elaboração (que implicam coagulação com leite cru seguida de um esgotamento lento do soro) enquanto que os espanhóis são, geralmente, maiores e mais duros.

Encara-se a avaliação sensorial como suporte técnico para assegurar a qualidade durante a produção e para atingir este objetivo, as Denominações de Origem necessitam aumentar os conhecimentos sobre os fenómenos responsáveis pelos principais atributos sensoriais para poder estabelecer sistemas que assegurem uma regularidade suficiente das características de qualidade do produto. A relação entre atributos sensoriais e as técnicas instrumentais é outro dos campos aonde se está a dedicar enormes esforços de investigação [7].

Para a determinação rotineira da qualidade nas indústrias torna-se necessária a utilização de técnicas objectivas, rápidas, suficientemente fiáveis e que não sejam muito caras. Com esta finalidade foram desenvolvidos equipamentos designados por Nariz Electrónico que são capazes de produzir respostas específicas em função dos compostos voláteis e de as classificar em grupos de qualidade que se previamente estabelecidos [8].

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo adquirimos queijos feitos artesanalmente, com leite cru de ovelha, proveniente da Região Demarcada para esta produção e coagulado com coalho vegetal extraído de cardos silvestres *Cynara cardunculus* L.

Os queijos foram elaborados em quatro queijarias, aprovadas para certificação de Queijo Serpa e localizadas nos concelhos de Beja, de Serpa e Moura que designaremos por A; I, S e M. Produzimos 4 lotes de 17 queijos no Inverno (Fevereiro a Março) e quatro na Primavera (Abril a Maio).

De cada lote foram recolhidos 3 queijos curados para análise sensorial e para análise com Nariz Electrónico (NE).

Os provadores foram seleccionados e treinados de acordo com o procedimentos da norma ISO 8589 (1988) [9] e a técnica utilizada foi a da ISO 3972 (1991) [10] e para a análise sensorial utilizávamos um sala de prova com 6 cabines individualizadas de 147 x 109 x 313 cm, equipadas com lâmpadas de cor branca.

Os atributos avaliados em cada uma das amostras de queijo foram Forma (irregular / regular) Casca (fina / grossa), Casca (irregular / lisa), Pasta (cor branca / amarelada), Pasta (cremosa / dura), Pasta (heterogénea/ homogénea), Intensidade de Cheiro (pouco / muito), Cheiro (normal / estranho), Textura (cremosa / granulosa), Gosto (pouco / muito salgado), Gosto (pouco / muito amargo), Gosto (pouco / muito ácido), Gosto (pouco / muito doce), Intensidade de Fleivor (pouco / muito), Fleivor (normal / estranho), Intensidade de Gosto residual (pouco / muito), Cura (fresco / passado) assim como foi efectuada uma avaliação hedónica de melhor a pior de cada amostra.



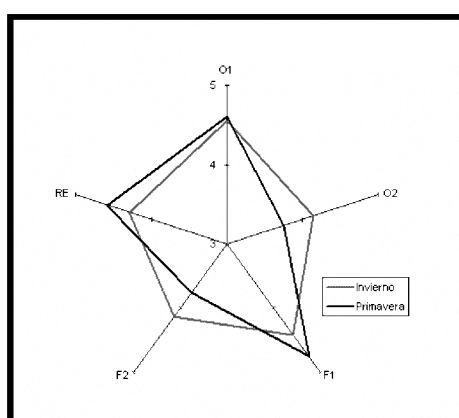
O material usado para a detecção electrónica de aromas foi um equipamento designado por Nariz Electrónico (NE) modelo AromaScan com 32 sensores.

As determinações estatísticas de Médias, Máximo, Mínimo, Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV) realizaram-se utilizando um programa Microsoft Excel 97 e para as restantes determinações estatísticas se usou o programa STATISTICA for Windows 5 (1997).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

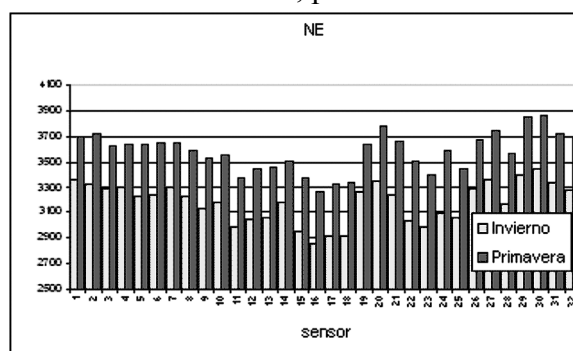
A avaliação sensorial mostrou a existência de diferenças significativas em sabor e fleivor dos 2 lotes de queijos produzidos no Inverno e na Primavera, que apresentaram também uma textura mais cremosa e um sabor mais intenso na Primavera.

Na Figura 1 podemos analisar os resultados de cheiro e fleivor com maior intensidade na Primavera, com Gosto Residual mais intenso no Inverno.



**Figura 1.** Resultados de cheiro (O1, intenso y O2, normal), de fleivor (F1, intenso e F2, normal) e Gosto Residual de queijos elaborados nas duas épocas, Inverno e Primavera.

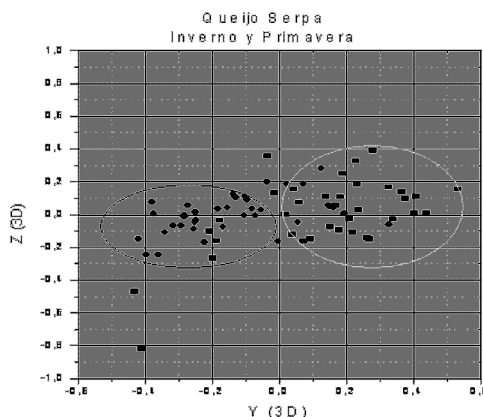
Os resultados de Cheiro e Fleivor são mais intensos e menos estranhos na Primavera assim como o Gosto Residual é mais intenso. O Cheiro e Fleivor também se revelaram mais intensos e mais agradáveis na Primavera, assim como no queijo com maior duração de cura. Os resultados médios obtidos com as amostras de Queijo Serpa empregando o Nariz Electrónico nas épocas de Inverno e Primavera, podem observar-se na Figura 2.



**Figura 2.** Resultados dos 32 sensores do NE de queijos produzidos no Inverno e Primavera.

A análise dos resultados na Figura 2 e o teste de comparação de medias (Tukey, com  $p \leq 0,05$ ) permitem concluir que existem diferenças significativas nos resultados obtidos nas duas épocas de produção com todos os sensores e com valores mais elevados na Primavera.

A Figura 3 permite observar como se agruparam as amostras dos queijos produzidos nas épocas de Inverno e Primavera.

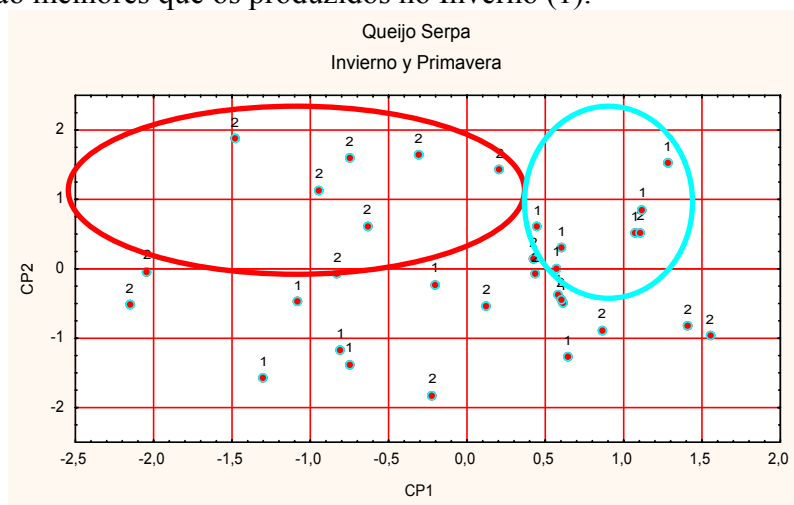


**Figura 3.** Representação gráfica das amostras de queijos elaborados na época de Inverno e Primavera, com os 32 sensores do NE.

Admitimos que estes resultados são influenciados pela composição do leite relacionada com uma alimentação de Primavera com grande componente de pastagem natural da região.

## 5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados em componentes principais com os queijos produzidos nas duas épocas, na Figura observa-se que os queijos de Primavera (2) apresentam pasta mais homogênea e são melhores que os produzidos no Inverno (1).



**Figura 4.** Distribuição dos queijos, identificados por época de produção Inverno (1) e Primavera (2), no Plano Principal formado pelas 2 primeiras componentes principais (CP1 e CP2)

Os resultados analisados anteriormente (Figuras 2, 3 e 4) e os obtidos com correlações da avaliação sensorial efectuada por um painel de provadores qualificado e os registos do NE, mostram que este equipamento é eficiente na identificação dos 2 lotes de Queijo Serpa avaliados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Canada JSB (1997) *Caracterización organoléctica y microbiológica de los quesos tradicionales portugueses*. Terceras Jornadas Intersectoriales y Transfronterizas sobre el Queso de la Comarca de Casar de Cáceres. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Cáceres.

- [2] Canada JSB (1998) Caracterização dos queijos tradicionais portugueses. *Via Láctea* (12), 32-34.
- [3]. Portaria n.º 252/91. *Diário da República, 1 Série, n.º 71 de 26 de Março 1991*. Concede o Estatuto de Entidade Certificadora do Queijo Serpa à ACOS- Associação de Criadores de Ovinos do Sul.
- [4]. Decreto Regulamentar n.º 39/87. *Diário da República, 1 Série, nº146 de 29 de Junho de 1987*. Cria a Região Demarcada do Queijo Serpa.
- [5]. Hernández P T (2000) Bases científicas del analisis sensorial. *Alimentaria, Ene-Feb.*, 155-165.
- [6]. Freitas AC, Macedo AC, Malcata FX (2000) Revisión : Aspectos tecnológicos y sensoriales de quesos con denominación de origen elaborados en la Península Ibérica con leche de oveja y de cabra. *Food Sci. Tech. Int.* 6 (5), 351-370.
- [7]. Elortondo FJ P, Bárcenas Eguía P, Albisu Aguado M (2000) Analisis sensorial en quesos con Denominacion de Origen. *Alimentaria, Ene-Feb.*, 165-167.
- [8]. Carrapiso AI (1999) *Estudio comparativo de métodos de análisis sobre grasa de cerdo ibérico usadas en la detección de la alimentación recibida*. Tesis de licenciatura. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Cáceres.
- [9]. ISO 3972 (1991) *Analyse sensorielle. Méthodologie. Méthode d'éveil à la sensibilité gustative*. Ed2. International Organization for Standardization. Bruxelles.
- [10] ISO 8589 (1988) *Analyse sensorielle. Directives generales pour la conception de locaux destinés à l'analyse*. International Organization for Standardization. Bruxelles.

## **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DO LEITÃO DE NEGRAIS, EMBALADO EM ATMOSFERA MODIFICADA**

*Caeiro, M.*

Leitões de Negrais, Lda. Av. General Barnabé António Ferreira, 113 Negrais. 2715-315 Almargem do Bispo. Portugal. E-mail:comercial@leitoesdenegrais.pt

O leitão assado de Negrais é um produto tradicional português muito apreciado pelos consumidores. Mantendo o processo tradicional, este produto é obtido através da assadura em fornos a lenha. A aplicação de atmosfera modificada em produtos alimentares, tem como objectivo o aumento da validade dos mesmos, de modo a simplificar o seu uso por parte dos consumidores.

O objectivo deste trabalho, foi determinar o período de vida útil deste produto tradicional, utilizando atmosfera modificada, com misturas de gases diferentes. O leitão assado foi embalado sob aerobiose (controlo) e com 100% Ar (G<sub>1</sub>), 70%N<sub>2</sub> e 30%CO<sub>2</sub> (G<sub>2</sub>), 80% Ar e 20%CO<sub>2</sub> (G<sub>3</sub>). As embalagens em atmosfera modificada, foram obtidas através de uma máquina de selar EFABIND (EFAMAN, Espanha) com 90% de vácuo e 85% de injeção de mistura de gás, usando embalagens de poliestireno Lintop MBA e filme com permeabilidade de <5 cm<sup>3</sup> para O<sub>2</sub>, <25 cm<sup>3</sup> para CO<sub>2</sub> and <3 cm<sup>3</sup> para H<sub>2</sub>O.

As amostras foram embaladas e armazenadas no escuro a 4°C±1°C. As análises microbiológicas e físico-químicas foram efectuadas aos 0, 7, 11, e 14 dias após embalagem.

As amostras foram avaliadas em termos de contagem de microrganismos psicotróficos aeróbios, *Enterobacteriaceae*, microrganismos aeróbios mesófilos. Avaliou-se ainda o valor de azoto básico volátil total (ABVT) e o teor de ácido Tiobarbitúrico (TBA).

Ao 14º dia de armazenamento, as embalagens com G<sub>2</sub>, mostraram um período de vida útil mais alargado com contagens significativamente (p <0,05) mais baixas de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, microrganismos psicotróficos e ABVT, quando comparado com o controlo e G<sub>1</sub>. As amostras em G<sub>3</sub>, apresentaram um valor de TBA semelhante a G<sub>2</sub>, não se atribuindo efeito antioxidante ao Argon.

# CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÓLISE NO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO DO PICO

*Dapkevicius, A. \*, Dapkevicius, E.M. L. N., Moreira, S. e Silva, C. C. G.*

CITA-A, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias  
Terra Chã, 9701-851 Angra do Heroísmo  
Tel +351-295 402 200 Fax + 351-295 402 205 e-mail: airidas@notes.angra.uac.pt

**Palavras-chave:** proteólise, maturação, fracções azotadas, queijo artesanal, produtos tradicionais

**Resumo:** O queijo do Pico é produzido artesanalmente a partir de leite de vaca cru, em pequenas queijarias localizadas na Ilha do Pico (Açores, Portugal). Tem estatuto D. O. P. desde 1996. Apesar deste queijo ser muito apreciado pelos consumidores açorianos, sabe-se pouco sobre os processos bioquímicos que contribuem para as suas propriedades sensoriais únicas. Para que se possa preservar o modo tradicional de produção deste queijo, que faz parte da cultura açoriana, é importante que se realizem estudos tendo a vista a sua caracterização.

Prepararam-se três lotes de queijo em três queijarias tradicionais da Ilha do Pico (Açores, Portugal), com um intervalo de um mês entre cada lote. Analisaram-se amostras de queijos dos três lotes durante o período de maturação (ao fim de 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias), tendo-se determinado o azoto solúvel total (NST), o azoto solúvel em ácido tricloroacético a 2% (2% TCA-N), o azoto solúvel em 12% TCA (12% TCA-N) e o azoto solúvel em ácido fosfotúngstico a 5% (5% PTA-N), a humidade, pH e concentração de sal na fase aquosa. No final do período de maturação, a proteólise foi moderada, conforme indicam os índices de azoto estudados. Os valores mais elevados, obtidos no final do período de maturação, foram 15% azoto total (TN), 4,6% TN, 4,3% TN e 0,7% TN para o NST, 2% TCA-N, 12% TCA-N e 5% PTA-N, respectivamente. Não se observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre queijarias e lotes no que respeita aos valores obtidos para as diferentes fracções azotadas. A concentração de sal na fase aquosa diferiu entre queijarias e lotes, atingindo valores finais entre 2,1 e 5,4%. O valor médio de pH no queijo do Pico, durante todo o período de maturação, foi de 5,1.

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo do Pico é preparado por métodos artesanais, tradicionais, na ilha com o mesmo nome, na Região Autónoma dos Açores. É um produto com elevada procura no mercado local e muito apreciado pelos consumidores, que atravessa presentemente dificuldades relacionadas com a necessidade de conciliar metodologias artesanais de produção com as exigências e a competitividade do mercado actual. Tratando-se dum elemento emblemático da cultura gastronómica açoriana, importa delinear estratégias que garantam a sua conservação e melhoria. Estas estratégias necessitam de ser fundamentadas por estudos extensos e concertados que permitam compreender os processos bioquímicos, microbiológicos e sócio-económicos que estão na base do carácter único deste queijo.

O queijo do Pico obteve estatuto D. O. P. em 1996. Tem uma forma cilíndrica muito baixa (2 – 3 cm de altura  $\times$  16 – 17 cm de diâmetro) e pesa 650 – 800 g. O período de maturação dura cerca de três semanas, à temperatura de 11 °C. As especificações para este produto prevêm um teor em humidade entre 67 – 71% no final da cura (queijo de pasta mole)<sup>1</sup>. A salga é feita esfregando o topo e o fundo do queijo com sal cristalizado. Este processo é repetido várias vezes durante a maturação.

Embora existam já muitos dados sobre outros queijos D. O. P. portugueses, recentemente revistos por Freitas e Malcata<sup>2</sup>, não existem, até à data, quaisquer trabalhos publicados sobre os aspectos bioquímicos da maturação do queijo do Pico. O objectivo deste trabalho foi realizar pesquisa pioneira sobre a dinâmica das fracções azotadas durante maturação do queijo do Pico, tendo em vista a caracterização da proteólise. Este conhecimento é indispensável para a melhoria e preservação de um dos dois únicos queijos portugueses tradicionais fabricados a partir de leite de vaca cru com Denominação de Origem Protegida.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

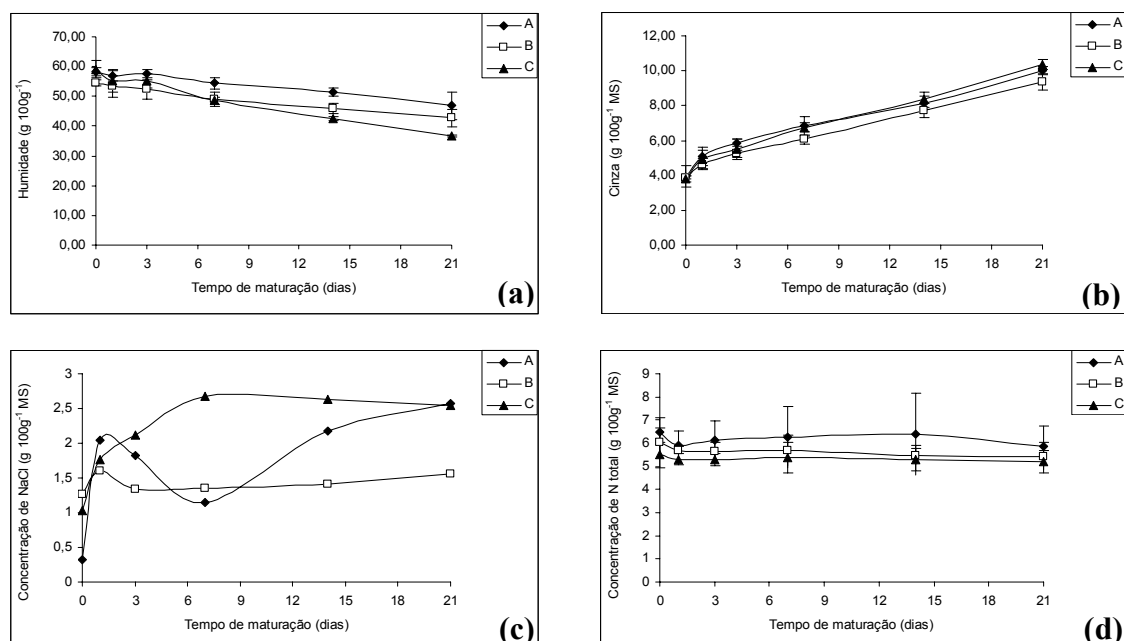
Prepararam-se três lotes de queijo do Pico, com intervalos de um mês, em três queijarias diferentes, situadas na Ilha do Pico, Açores. Ao fim de 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias de maturação tomaram-se dois queijos de cada um dos nove lotes para determinar o pH, parâmetros de composição química (humidade, cinza em % da matéria seca, azoto total em % da matéria seca), a concentração de NaCl (em % da matéria seca) e fracções azotadas, indicadoras da extensão e profundidade da proteólise (azoto solúvel total, azoto solúvel em ácido tricloroacético a 2%, azoto solúvel em ácido tricloroacético a 12% e azoto solúvel em ácido fosfotúngstico a 5%).

A humidade foi determinada pela Norma Portuguesa NP 3544<sup>3</sup>, a cinza pelo método gravimétrico AOAC 16.267<sup>4</sup>, a concentração de NaCl pelo método AOAC 24.011<sup>4</sup> e o azoto total pelo método micro-Kjeldahl. As fracções azotadas foram determinadas de acordo com o método descrito por Macedo e Malcata<sup>5</sup> e o pH por potenciometria.

Com recurso a uma folha de cálculo, prepararam-se tabelas ANOVA para os resultados de cada parâmetro, com o objectivo de avaliar a significância dos efeitos das queijarias, lotes e dias de maturação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

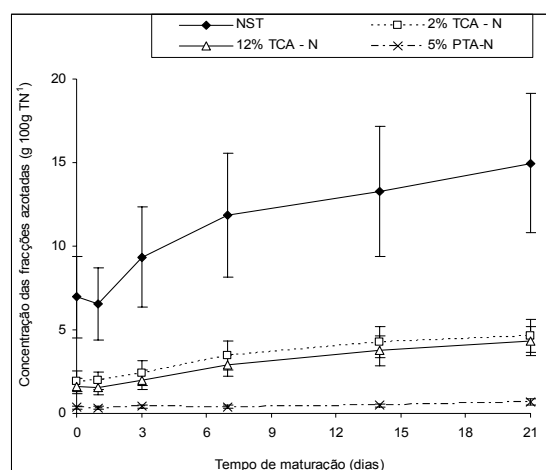
Os resultados da análise à composição química encontram-se na figura 1. Os teores em humidade dos queijos diminuíram durante a maturação, atingindo no final da mesma valores inferiores aos preconizados nas especificações para o queijo do Pico. O processo de “prensagem” é feito com as mãos do operador, o que introduz uma considerável fonte de variação. Verificaram-se, por isso, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre produtores, em especial a partir do 7.º dia de maturação. Os valores do teor em cinzas dos queijos aumentaram durante a maturação, reflectindo a perda de humidade, pelo que também este parâmetro apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre produtores a partir do final da primeira semana de maturação. Os teores em cinza no produto final obtidos assemelharam-se aos doutros queijos tradicionais produzidos a partir de leite cru<sup>6</sup>. A concentração em sal aumentou durante a maturação, com diferenças consideráveis entre produtores, reflectindo o processo manual e altamente variável de aplicação de sal. Em comparação com os teores em sal doutros queijos artesanais ibéricos, o queijo do Pico tem concentrações relativamente baixas de NaCl<sup>2</sup>. Não se observaram variações significativas ( $p < 0,05$ ) da concentração em azoto total do queijo do Pico nem durante a maturação, nem entre queijarias, nem entre lotes. Os valores de azoto total encontrados foram comparáveis aos doutros queijos tradicionais produzidos a partir de leite cru<sup>7,8</sup>. O pH do queijo do Pico variou pouco durante a maturação, entre produtores e entre lotes, situando-se nos  $5,1 \pm 0,1$  (dados não apresentados). As diferenças observadas não foram significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1** – Dinâmica dos parâmetros da composição química de queijo do Pico produzido em três queijarias (A, B e C). (a) Humidade, (b) Cinza, (c) Concentração em NaCl, (d) Concentração de Azoto Total. Os valores representam as médias e as barras de erro os desvios padrão (n = 3), com exceção da concentração de sal (médias de 2 valores).

Os resultados da análise das fracções azotadas reflectem o curto período de maturação do queijo do Pico (figura 2). Obteve-se um baixo teor em NST, indicando uma proteólise pouco extensa. Verificaram-se diferenças acentuadas entre queijarias, reflectindo a variabilidade dos processos produtivos. Os teores em 2% e 12% TCA-N sofreram um aumento superior ao dobro durante a maturação, mas apresentaram ainda valores relativamente baixos ao fim dos 21 dias estudados, indicando que o tempo de maturação não foi suficiente para que se obtivesse uma proteólise profunda. Contudo, noutros queijos com tempos de maturação mais prolongados, os resultados obtidos ao fim dum número de dias idêntico foram semelhantes<sup>9</sup>. Reflectindo uma vez mais o curto período de maturação, os valores de 5% PTA-N mantiveram-se baixos durante todo o período experimental. Os resultados obtidos assemelham-se aos doutros autores, se tivermos em conta períodos de maturação semelhantes<sup>9</sup>. Não se verificaram diferenças significativas nem entre queijarias, nem entre lotes em relação aos valores de 2% TCA-N, 12% TCA-N e 5%TCA-N.

Os valores das fracções azotadas obtidos indicaram que a proteólise no final do tempo mínimo de cura do queijo do Pico é ainda pouco extensa e pouco profunda. Há relatos de tempos de cura muito mais prolongados praticados antigamente, quando a produção do queijo do Pico era doméstica. A redução do tempo de cura tem sido uma tendência, em parte devido à produção não ser suficiente para satisfazer a procura e em parte como forma de minimizar a imobilização de capital inerente a períodos de cura prolongados. Seria interessante determinar a relação entre as preferências do consumidor em termos de características sensoriais e a extensão e profundidade da proteólise, de modo a estabelecer o tempo ideal de cura para este queijo.



**Figura 2** – Fracções azotadas em queijo do Pico durante a maturação: azoto solúvel total (NST), azoto solúvel em ácido tricloroacético a 2% (2% TCA-N), azoto solúvel em ácido tricloroacético a 12% (12% TCA-N) e azoto solúvel em ácido fosfotúngstico a 5% (5% PTA-N). Os valores representam a média e as barras de erro representam o desvio padrão (n=9).

#### Referências

- [1] – S.R.A.P. – *Jornal Oficial n.º 44 de 29/10/96, II série* (1996)
- [2] – C. Freitas, F.X. Malcata – *J. Dairy Sci.* **83** (2000) 584
- [3] – Anón. – *Queijos e queijos fundidos. Determinação do resíduo seco e do resíduo seco isento de matéria gorda*, IPQ (1987)
- [4] – Anón. – *Official Methods of Analysis (14th ed.)*, AOAC (1984)
- [5] – A.C. Macedo, F.X. Malcata – *Z. Lebensm Unters. Forsch.* **204** (1997) 173
- [6] – A.C. Macedo, F.X. Malcata, J.C. Oliveira – *J. Dairy Sci.* **76** (1993) 1725
- [7] – L. Cabezas, I. Sánchez, J.M. Poveda, S. Sesena, M.L.L. Palop – *Food Control* **18** (2007) 11
- [8] – C. Ballesteros, J.M. Poveda, M.A. González-Viñas, L. Cabezas – *Food Control* **17** (2006) 249
- [9] – F.K. Tavora, I. Franco, F.J. Carballo, F.X. Malcata – *Int. Dairy J.* **13** (2003) 537



# COMPARAÇÃO DE ALGUNS COMPOSTOS DO AROMA DE AZEITES OBTIDOS POR DOIS MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DIFERENTES

*Marques, P.A.; Vaz-Freire, L.<sup>1</sup>; Freitas, A.M.*

Departamento de Fitotécnica, Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora –  
Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

Tel: +351 266760800 Fax: +351 266760828 Email: [luisvf@uevora.pt](mailto:luisvf@uevora.pt)

**Palavras – -Chaves:** Azeite, SPME, GC-MS, Qualidade

**Resumo:** A determinação dos principais compostos do aroma de azeites responsáveis pelos atributos positivos e negativos do aroma de azeites de variedades Portuguesas (Carrasquenha, Cobrançosa e Galega Vulgar) foram estudados a partir do método microextracção em fase sólida (SPME), em *headspace*, e posterior análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). Avaliou-se dois revestimentos diferentes de fibras para SPME: Poliacrilato (PA) e Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Foram identificados 42 compostos do azeite. Este estudo permitiu verificar que esta técnica de separação e identificação de compostos voláteis permite a extracção de um número de compostos capazes de determinar o perfil final de aroma de um azeite, permitindo ainda a diferenciação entre azeites obtidos por métodos de extracção diferentes: método clássico/Prensa e método por Centrifugação de Duas Fases. Para os azeites estudados provenientes do Sistema de Prensa apresentaram características negativas “Avinhado-avinagrado” e pequenas notas positivas de “Frutado” e “Amargo”. Os azeites de Duas Fases apresentaram características negativas de “Ranço” mas notas superiores de “Frutado” e “Amargo”.

## 1. INTRODUÇÃO

O azeite é o mais aromático de todos os óleos vegetais utilizado para consumo humano, possuidor de peculiares características sensoriais. Estas características sensoriais, em conjunto com aspectos nutricionais e até medicinais são responsáveis pelo aumento do consumo de azeite nos últimos anos [1]. Diversos compostos químicos voláteis presentes no azeite, quando transportados pelo ar são responsáveis pela estimulação dos receptores olfactivos. Estes compostos presentes na fracção volátil do azeite, pertencem a diversas classes químicas entre elas aldeídos, alcóois, ésteres, hidrocarbonetos e cetonas [2] responsáveis pelas características sensoriais de um azeite. Diversos factores são responsáveis pelo surgimento de compostos que determinam as características sensoriais distintas, entre azeites monovarietais [3]. Estes factores poderão ser geográficos, climáticos, agronómicos e/ou condições tecnológicas durante o processamento do azeite [3], nomeadamente o sistema de extracção adoptado. Os métodos de extracção mais utilizados nos nossos dias são os métodos de Centrifugação e o tradicional método de Prensa. Para se obter azeites de qualidade através do método de Prensa [4;5], primeiro que tudo deve-se ter azeitonas de boa qualidade e o processo de extracção deverá ser feito de forma contínua de modo a prevenir processos de fermentação e/ou degradação de resíduos da polpa ou da água de vegetação nos capachos, que contribuirão de forma negativa para as características sensoriais do azeite. No caso dos métodos por Centrifugação [4;5], a adição de água no sistema de Três Fases leva a perda de compostos voláteis, especialmente em compostos fenólicos, mas o aparecimento mais recente do sistema de Duas Fases, não requerendo a adição de água, veio contornar este problema. Compostos C6 e C5, principalmente aldeídos em C6 de cadeia linear saturada e insaturada, representam a fracção mais importante que contribuem para a boa qualidade de um azeite do ponto de vista qualitativo. Estes compostos C6 e C5 são produzidos a partir de processos enzimáticos de degradação de ácidos gordos poliinsaturados, aos quais denominamos por “Via da Lipoxigenase” [2;3]. Para além deste processo enzimático, também outros

mecanismos como foto-oxidação, auto-oxidação ou fermentações, são igualmente responsáveis pelo surgimento de compostos determinantes de um perfil de aroma final de um azeite. A concentração na qual se encontra cada composto num determinado azeite, contribuem igualmente para o aroma final. Diversos métodos têm vindo a ser desenvolvidos para análise qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis do aroma do azeite. Entre eles, a microextração em fase sólida no modo *headspace* (SPME-HS) [6]. Consiste no uso de uma fibra com uma fase estacionária, onde os compostos são extraídos dependendo da afinidade entre estes e a natureza do revestimento da fibra. Comercialmente, existem diversos tipos de revestimentos para uso em amostras voláteis, com diferentes polaridades [7]. O método consiste em expor durante um determinado período de tempo a fibra à fase de vapor (*headspace*) em equilíbrio com a amostra de azeite, que se encontra num vial selado, e sujeito a uma determinada temperatura controlada. Finalizada a extração, a fibra é rapidamente inserida no injector do cromatografo e sujeita a dessorção térmica, segundo condições pré-definidas pelo operador [8;9]. Através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é feita a separação e identificação dos compostos [9]. Para quantificação destes compostos muitos são os métodos que poderão ser adoptados pelo operador, entre os quais o método de Padrão Interno [10]. Com esta técnica de extração, SPME, já foram identificados mais de 130 compostos responsáveis pelos atributos sensoriais do azeite.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Azeites monovarietais das variedades Portuguesas Carrasquenha, Cobrançosa e Galega Vulgar obtidos pelo método de Prensa e pelo método de Duas Fases.

### **2.2. SPME-*headspace***

Os compostos voláteis das amostras de azeites em estudo foram extraídos por SPME, no modo *headspace*. Utilizaram-se vials escuros de 20mL (*Macherey-Nagel*, Düren, Alemanha), nos quais se introduziram 6 e 12g de azeite, tendo sido adoptado as 12g. Foram avaliadas duas fibras de diferentes revestimentos para SPME: Poliacrilato (PA) (85µm de espessura de filme) e Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (30-50µm de espessura de filme e 2cm de comprimento) da *Supelco Inc.* (Bellefonte, Pennsylvania). A fibra escolhida foi a DVB/CAR/PDMS. A fibra antes de cada extração, foi condicionada durante 5 minutos a 260°C, ao mesmo tempo que a amostra de azeite foi sujeita a pré-homogeneização à temperatura de extração de 40°C. A amostra foi ainda submetida a agitação magnética uma velocidade de 1000 rpm. O tempo de extração fixou-se em 30 minutos. Após extração a fibra, foi inserida imediatamente no injector do cromatografo a uma temperatura de dessorção de 260°C (equipado com um *liner* de 0,8mm de D.I.), em modo *splitless*, durante 5 minutos.

### **2.3. Análise por GC-MS**

Na análise por GC-MS foi utilizado um Trace GC *ThermoFunnigan* (Thermo Unicam) acoplado ao detector de massa *PolarisQ*. Recorreu-se a uma coluna capilar de silica fundida Rtx WAX (60m × 0,32mm D.I., 0,5µm espessura de filme) da *Restek* (Bellefonte, Pennsylvania). A temperatura da fonte iónica foi afixada, em conjunto com a interface, em 230°C. O gás de arraste foi o Hélio, a uma pressão constante de 100 Kpa. Foram testados diferentes programas de temperatura do forno, tendo sido adoptado o seguinte: a temperatura inicial foi de 50°C durante 3 minutos, seguido de uma rampa de 2°C/minuto até à temperatura de 210°C/0 minutos seguido de uma segunda rampa linear de 10°C/minuto até à temperatura final de 240°C, onde permaneceu durante 10 minutos.



mais afastados da origem, surgem os compostos Ácido acético (atributo “avinhado-avinagrado”), Hexano, *cis*-2-Hexen-1-ol (atributo “Amargo”), *trans*-2-Hexenal (atributo “Frutado”) e octanal (atributo “Ranço”) que parecem discriminar as amostras de azeite do método de Prensa das amostras obtidas pelo método de Duas Fases, ao longo da 2ª componente principal.

#### 4. CONCLUSÃO

Os azeites provenientes do sistema de Prensa apresentaram notas sensoriais negativas de “Avinhado-avinagrado” provavelmente, devido à descontinuidade deste sistema de extracção. Os azeites de Duas Fases apresentaram um perfil “Frutado” e “Amargo” com notas sensoriais de “Ranço” sinal de intensa oxidação devido ao prolongado contacto com borras ou devido a alterações climatéricas (temperatura, luminosidade, etc.) durante o processo de armazenamento. O método analítico SPME-GC-MS mostrou ser um método simples e rápido de identificação de compostos do aroma capazes de determinar um perfil do aroma de um óleo vegetal tão complexo como o azeite.

#### Referências

- [1] - Aparicio, R.; Luna, G. *Characterization of monovarietal virgin olive oils*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002, 104, 614-627.
- [2] - Ridolfi, M.; Patume, M.; Fontanazza, G. *Characterization of the lipoxygenases in some cultivars and determination of their role in volatile compounds formation*. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 835-839.
- [3] - Angerosa, F.; Servili, M.; Esposto, S. *Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with quality*. J. Chromatography A., 2004, 1054, 17-31.
- [4] - Angerosa, F.; Mostallino, R.; Basti, C. *Virgin olive oil differentiation in relation to extraction methodologies*. J. Sci. Food Agric. 2000, 80, 2190-2195.
- [5] - Ranalli, A.; Gomes, T.; Lucera, L. *Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies*. J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 2597-2602.
- [6] - Jélen, Henryk H; Obuchowska, M.; Wasowicz, H. *Headspace Solid-Phase Microextraction use for characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality*. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 2360-2367
- [7] - [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)
- [8] - Arthur, C.L.; Pawliskn, J. *Solid-phase Microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibres*. Analytical Chemistry, 62, 1990. 2145-2148.
- [9] - Chaves das Neves, H.J.; Costa Freitas, A.M. *Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*. Editor Dias de Sousa Lda, 1ª Edição, Janeiro, 1996, 207p.
- [10] - [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com).
- [11] - Angerosa, Franca *Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensors panels*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002, 104, 639-660.
- [12] - Morales, M. T.; Luna, G.; Aparício, R. *Comparative study of virgin oil sensory defects*. J. Agric. Food Chem. 2004.
- [13] - Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S. *Volatile compounds and phenolics composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process*. 2003, 51, 7980-7988.
- [14] - Morales, M. T.; Luna, G.; Aparício, R. *Sensory and chemical evaluation of winey-vinegary defect in virgin olive oils*. Eur. Food Res. Technol. 2000, 211, 222-228.
- [15] - Morales, M.T.; Rios, J.J.; Aparício, R. *Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors*. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 2666-2673.
- [16] - Cavalli, Jean-François; Fernandez, X.; Loiseau, A. *Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: identification of quality-freshness markers*. J. Agric. Food Chem. 2004, 88, 151-157.

# CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE ALGUNS PRODUTOS DE SALSICHARIA

*Fernandes, M.J. \*, Fraqueza, M.J., Ferreira, M.C., Fernandes, H., Santos, P., Barreto, A.S.*

Faculdade de Medicina Veterinária-CIISA. Avenida da Universidade Técnica, Polo Universitário, Alto da Ajuda 1300-477 Lisboa. Tel/fax: 213 652 880 e-mail: mjfernandes@fmv.utl.pt

Palavras-chave: produtos de salsicharia, informação nutricional, valor calórico, composição centesimal

## RESUMO

O consumo de produtos de salsicharia é comum na dieta mediterrânica. No entanto, eles são tidos como alimentos de elevado valor calórico e o seu consumo tem sido associado a doenças do foro cardiovascular. A maioria dos produtos de salsicharia disponíveis no mercado, não apresenta informação nutricional, a qual seria um atributo a acrescentar na rotulagem, facilitando a escolha do consumidor, visto que nem todos apresentarão o mesmo aporte energético. Este trabalho surge como uma tentativa de caracterização nutricional de alguns produtos de salsicharia. Com esse objectivo, utilizaram-se resultados de análises físico-químicas realizadas a um total de 383 amostras (fiambre da perna, n=31; fiambre da pá, n=12; filete afiambrado, n=18; mortadela, n=18; paio York; n=18; painho, n=13; toucinho fumado, n=9; chouriço corrente, n=217; chouriço, n=26; salpicão, n=7; linguiça, n=14). Estas análises, realizadas no âmbito do controlo de qualidade, foram efectuadas em produtos finais de salsicharia de diferentes indústrias, a serem colocados no mercado. O valor energético foi determinado, utilizando os coeficientes de conversão de Atwater, expressando-se os resultados em kcal e em kJ por 100 gramas da parte edível. Concluiu-se que estes produtos apresentam distintas características nutricionais; com base nos resultados obtidos, propõe-se, tentativamente, a classificação em três grupos: (1) Baixo valor calórico: (<150 kcal/100g <=> 627 kJ/100g) que inclui produtos como o Fiambre da Perna, Fiambre da Pá e o Paio York; (2) Médio valor calórico: (entre 150 e 300 kcal/100g <=> 627 e 1254 kJ/100g) para produtos como Painho, Filete Afiambrado, Salpicão e Mortadela; (3) Alto valor calórico: (>300 kcal/100g <=> 1254 kJ/100g) que caracteriza produtos como o Toucinho Fumado, Chouriço, Linguiça e Chouriço Corrente.

## 1. INTRODUÇÃO

A legislação vigente relativa à rotulagem nutricional torna-a obrigatória só quando uma alegação nutricional consta do rótulo, da apresentação ou da publicidade, com excepção das campanhas publicitárias colectivas, sendo facultativa em todos os outros casos <sup>[1]</sup>.

Verifica-se que a indústria alimentar está empenhada em melhorar a informação nutricional que actualmente é disponibilizada, de forma voluntária, aos consumidores. Muitas empresas já incluem a informação nutricional no rótulo dos seus produtos de forma mais completa do que as regras legais <sup>[2]</sup>. No que respeita a produtos de salsicharia disponíveis no mercado, a maioria, contudo, não apresenta informação nutricional. Esta seria um atributo qualitativo explícito a acrescentar na rotulagem, facilitando a escolha do consumidor, visto que nem todos os produtos apresentarão o mesmo aporte energético.

A importância da rotulagem nutricional dos alimentos para a promoção de uma alimentação saudável é destacada em grande parte dos estudos e pesquisas que envolvam a área da nutrição, estando implicada nas estratégias definidas para a redução de doenças crónicas da sociedade ocidental actual.

Presentemente o consumidor mais informado e exigente requer conhecimentos sobre a composição do alimento, definindo a sua escolha de modo a promover uma dieta mais equilibrada e saudável. Este trabalho teve por finalidade determinar a composição química e o valor calórico de alguns produtos de salsicharia disponíveis no mercado, na expectativa de os

diferenciar no que respeita ao seu aporte energético. A pretensão desta distinção prendeu-se com a possibilidade de agrupamento de produtos que apresentem alguma similaridade relativa ao seu valor calórico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas análises físico-químicas a 383 amostras de 11 produtos finais de salsicharia de diferentes indústrias a serem colocados no mercado: fiambre da perna, fiambre da pá, filete afiambrado, mortadela, paio York, painho, toucinho fumado, chouriço corrente, chouriço, salpicão e linguiça.

Os métodos utilizados para a determinação da composição química são os recomendados pelas Normas Portuguesas referentes às Carnes e Produtos Cárneos, que incluem o teor de humidade [3] pela técnica de secagem em estufa a  $103 \pm 2$  °C até peso constante, o teor de proteína [4] pelo método de Kjeldahl utilizando o factor de conversão de azoto em proteína de 6,25, a composição em matéria gorda [5] pelo método de Soxhlet, a cinza total [6] por incineração a  $550 \pm 25$ °C e ainda o teor em hidratos de carbono que é determinado por cálculo. O valor energético foi calculado, utilizando-se os coeficientes de conversão de Atwater (4 kcal/g para proteínas e hidratos de carbono; 9 kcal/g para a matéria gorda), de acordo com o recomendado pelo Decreto-Lei nº 167/2004 de 7 de Julho, relativo à rotulagem nutricional dos géneros alimentícios, expressando-se os resultados em kcal e em kJ por 100 gramas da parte edível.

Para analisar a existência de semelhanças nos parâmetros da composição centesimal e do valor calórico nos produtos em estudo e possível agrupamento dos mesmos foi efectuada uma análise de componentes principais dos resultados obtidos utilizando-se o programa STATISTICA 6.0.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No modelo factorial encontrado as variáveis valor calórico, gordura e humidade foram as que apresentaram maior peso para a formação do factor 1, enquanto a proteína foi a variável que mais contribuiu para o factor 2 (Fig.1).

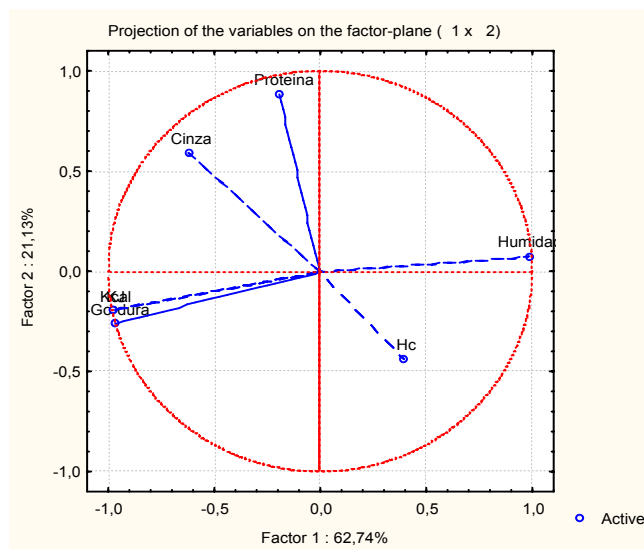


Figura 1: Projecção das variáveis analisadas no plano de factores 1 e 2.

Observaram-se dois grupos distintos na projecção das amostras quanto ao factor 1, que explicam 62,74% da variabilidade dos resultados, diferenciando-se um grupo (**a**) (Fig. 2) de produtos com baixo teor em humidade e elevado teor em gordura e valor calórico, como toucinho fumado (8), chourição (9), linguiça (10) e chouriço corrente (11) dos restantes produtos.

No eixo do factor 2, que explica 21,13% da variabilidade dos resultados, distinguiu-se um grupo (**b**) composto por filete afiambrado (5) e mortadela (7) apresentando os valores mais baixos de proteína, enquanto o grupo **c** constituído pelo painho (4) e pelo salpicão (6) e o grupo **d** que inclui o fiambre da perna (1), fiambre da pá (2) e paio York (3) apresentaram similaridade na sua componente proteica (Fig. 2).

No entanto, verificou-se que apesar da diferenciação proteica dos grupos **b** e **c**, eles apresentaram semelhante valor calórico, compreendido entre 150 e 300 kcal/100g, pelo que na análise da contribuição calórica, considerou-se pertencerem ao mesmo grupo.

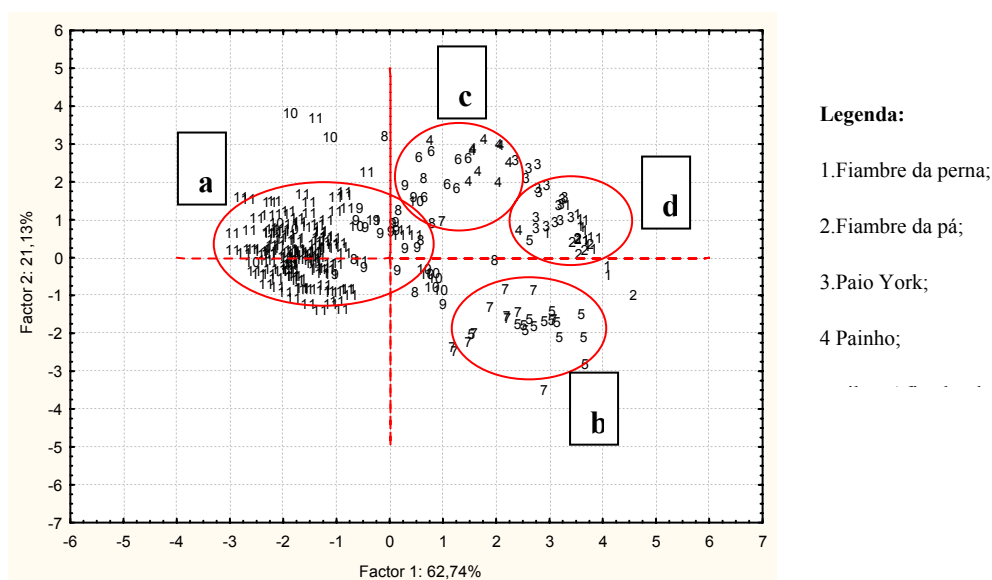


Figura 2: Projecção das amostras analisadas sobre o plano dos factores 1 e 2.

Assim, no que respeita ao valor energético agruparam-se os produtos de salsicharia analisados em três grupos diferentes (Tabelas 1, 2 e 3):

(1) Baixo valor calórico (grupo **d**): Produtos de salsicharia que apresentaram valor energético inferior a 150 kcal/100g (627 kJ/100g), que inclui produtos como o Fiambre da Perna, Fiambre da Pá e Paio York.

(2) Médio valor calórico (grupo **b** + grupo **c**): Produtos de salsicharia que apresentaram valor energético entre 150 e 300 kcal (627 e 1254 kJ/100g), como Painho, Filete Afiambrado, Salpicão e Mortadela.

(3) Alto valor calórico (grupo **a**): Produtos de salsicharia que apresentaram valor energético superior a 300 kcal (1254 kJ/100g), que caracterizam produtos como o Toucinho Fumado, Chourição, Linguiça e Chouriço Corrente.

**Tabela 1:** Média e desvio padrão ( $x \pm dp$ ) da composição centesimal e valor calórico de produtos de salsicharia com valor calórico inferior a 150 kcal/100g (627 kJ/100g)

| Produto                        | Humidade (%) | Proteína (%) | Gordura (%) | Cinza (%)   | H.C. (%)  | Valor calórico |          |
|--------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------------|----------|
|                                |              |              |             |             |           | Kcal/100g      | kJ/100g  |
| <b>Fiambre da perna (n=31)</b> | 75,3 ± 1,5   | 15,99 ± 1,48 | 3,3 ± 1,6   | 4,07 ± 0,34 | 1,8 ± 0,5 | 96 ± 13        | 401 ± 54 |
| <b>Fiambre da pá (n=12)</b>    | 76,1 ± 1,0   | 14,63 ± 0,85 | 4,0 ± 1,6   | 3,32 ± 0,63 | 0,9 ± 0,3 | 107 ± 10       | 446 ± 42 |
| <b>Paio York (n=18)</b>        | 69,4 ± 2,5   | 19,42 ± 2,34 | 4,5 ± 1,9   | 4,90 ± 0,46 | 1,8 ± 1,1 | 124 ± 16       | 519 ± 67 |

**Tabela 2:** Média e desvio padrão ( $x \pm dp$ ) da composição centesimal e valor calórico de produtos de salsicharia com valor calórico compreendido entre 150 e 300 kcal/100g (627 e 1254 kJ/100g)

| Produto                         | Humidade (%) | Proteína (%) | Gordura (%) | Cinza (%)   | H.C. (%)  | Valor calórico |            |
|---------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------------|------------|
|                                 |              |              |             |             |           | Kcal/100g      | kJ/100g    |
| <b>Painho (n=14)</b>            | 56,9 ± 7,9   | 23,91 ± 3,83 | 8,6 ± 3,4   | 5,39 ± 0,48 | 2,4 ± 1,7 | 194 ± 25       | 811 ± 103  |
| <b>Filete Afiambrado (n=14)</b> | 64,5 ± 4,5   | 10,86 ± 2,01 | 16,0 ± 4,3  | 3,40 ± 0,17 | 4,8 ± 1,6 | 208 ± 40       | 870 ± 167  |
| <b>Salpicão (n=7)</b>           | 52,2 ± 3,2   | 24,16 ± 1,57 | 15,7 ± 0,2  | 5,74 ± 0,21 | 2,2 ± 1,3 | 246 ± 27       | 1030 ± 113 |
| <b>Mortadela (n=14)</b>         | 55,0 ± 8,7   | 13,32 ± 3,02 | 23,3 ± 7,3  | 3,96 ± 1,72 | 5,8 ± 2,8 | 246 ± 37       | 1030 ± 157 |

**Tabela 3:** Média e desvio padrão ( $x \pm dp$ ) da composição centesimal e do valor calórico de produtos de salsicharia com valor calórico superior a 300 kcal/100g (1254 kJ/100g):

| Produto                          | Humidade (%) | Proteína (%) | Gordura (%) | Cinza (%)   | H.C. (%)  | Valor calórico |            |
|----------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------------|------------|
|                                  |              |              |             |             |           | Kcal/100g      | kJ/100g    |
| <b>Toucinho Fumado (n=9)</b>     | 46,5 ± 6,4   | 19,85 ± 2,66 | 24,3 ± 6,1  | 5,20 ± 1,30 | 2,4 ± 1,4 | 312 ± 50       | 1306 ± 207 |
| <b>Chouriço (n=26)</b>           | 43,3 ± 4,8   | 19,52 ± 2,40 | 30,7 ± 6,1  | 4,96 ± 0,61 | 2,0 ± 1,7 | 357 ± 36       | 1494 ± 149 |
| <b>Linguiça (n=14)</b>           | 39,3 ± 11,4  | 20,61 ± 5,81 | 33,6 ± 8,2  | 4,81 ± 1,15 | 2,0 ± 2,0 | 386 ± 79       | 1617 ± 329 |
| <b>Chouriço Corrente (n=217)</b> | 32,5 ± 5,1   | 17,72 ± 2,32 | 42,5 ± 6,9  | 5,50 ± 0,62 | 1,8 ± 1,2 | 461 ± 56       | 1929 ± 232 |

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] – Decreto-Lei nº 167/2004 de 7 de Julho. Relativa à rotulagem nutricional dos géneros alimentícios.
- [2] Boletim Informativo da Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares. FIPA. Nº 88. 2006.1p.
- [3] NP1614. Carnes e Produtos Cárneos. Determinação do teor de humidade. Método de referência. IPQ. 2002. 5 p.
- [4] NP1612. Carnes e Produtos Cárneos. Determinação do teor de azoto total. Método de referência. IPQ. 2002. 6 p.
- [5] NP1224. Carnes e Produtos Cárneos. Determinação do teor de matéria gorda livre. Método de referência. IPQ. 2002. 6 p.
- [6] NP1615. Carnes e Produtos Cárneos. Determinação do teor de cinza total. Método de referência. IPQ. 2002. 6p.



# CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ‘ÁGUA MEL’, UM PRODUTO TRADICIONAL ALGARVIO

*Cavaco, T.<sup>1</sup>; Dunning, N.<sup>2</sup>.; Figueira, A.C.<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Alimentar, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Algarve, Campus da Penha, 8005-139 Faro, Portugal Tel +351-289 800 100 Fax +351 289 888 405 e-mail: [afiguei@ualg.pt](mailto:afiguei@ualg.pt)

<sup>2</sup>Department of Biomedical and Natural Sciences, Nottingham Trent University, Clifton Campus, Clifton Lane, Nottingham.

**Palavras-chave:** Água mel, mel, HMF, cor, produto tradicional

**Resumo:** O estudo do processo de produção tradicional de “água mel” (um subproduto da indústria apícola), tem como objectivo a uniformização do seu processamento, de modo a melhorar a qualidade e garantir a homogeneidade do produto. Neste trabalho foi estabelecido o diagrama de fluxo do processo de produção de água mel. Durante este processo, foram recolhidas amostras, num total de 20, nas quais foram analisados parâmetros relevantes, nomeadamente °Brix, cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) no sistema CIE e hidroximetilfurfural (HMF). Foram efectuados estudos da cinética de algumas das reacções envolvidas neste processo. Realizaram-se ainda análises de regressão linear múltipla (MLR), com o objectivo de estabelecer equações que relacionem os diferentes parâmetros determinados.

## 1. Introdução

A água mel resulta do aproveitamento de alguns dos subprodutos da indústria do mel. Durante a época da cresta, após centrifugação e prensagem, todo o material que entra em contacto com o mel é escaldado com água fervente, de modo a remover o remanescente de mel ainda presente nos quadros de cera. A solução aquosa assim obtida é posteriormente sujeita a uma ebulição lenta. No decurso deste processo, têm lugar uma variedade de reacções físico-químicas, nomeadamente reacções tipo Maillard e de hidrólise ácida da sacarose, com uma concomitante síntese de hidroximetilfurfural (HMF) (1, 2 e 3). Este é um processo cuja origem se perdeu com o decorrer dos tempos, sendo tradicionalmente realizado a nível familiar, por pequenos e médios produtores do sector. Por conseguinte, trata-se de um processo artesanal, que não se encontra devidamente estudado e caracterizado.

Este trabalho teve como objectivos: i) Estabelecimento/construção de um diagrama de fluxo que descreva o processo tradicional de produção da água mel na região algarvia; ii) Identificação e estudos da cinética da síntese alguns dos compostos envolvidos no processo; iii) Construção de equações relacionando os diferentes parâmetros investigados.

## 2. Material e Métodos

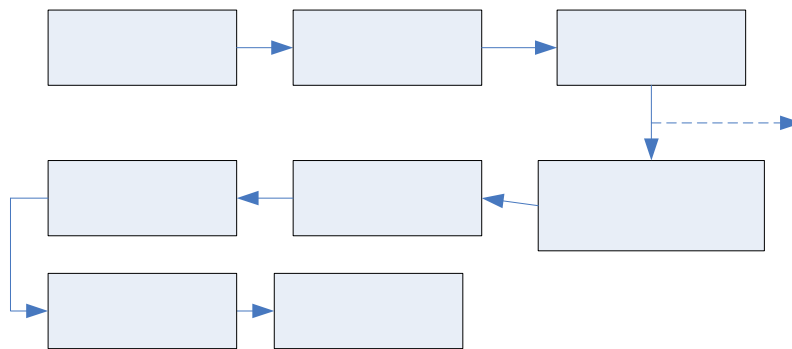
O resíduo seco solúvel (°Brix) foi determinado utilizando um refractómetro Abbe (Atago type 1 T, 4T de 1985) a leitura do índice de refração foi realizada a 20°C. Utilizando o colorímetro (NeurteK spectro- color) determinaram-se os vários parâmetros da cor. Procedeu-se de acordo com as especificações do aparelho calibrando o colorímetro antes da utilização, com o padrão preto (LZM 268;  $x = 84,60$ ;  $y = 89,46$ ;  $z = 93,85$ ) e branco (LZM 268;  $x = 4,12$ ;

$y = 4,38$ ;  $z = 4,71$ ). Colocou-se a amostra de água mel no porta amostras e mediu-se a refração  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  no espaço CIE.

O hidroximetilfurfural (HMF) foi determinado de acordo com o método descrito no AOAC para mel (AOAC 980.23 (2005)). Os resultados foram expressos em mg/kg de água mel.

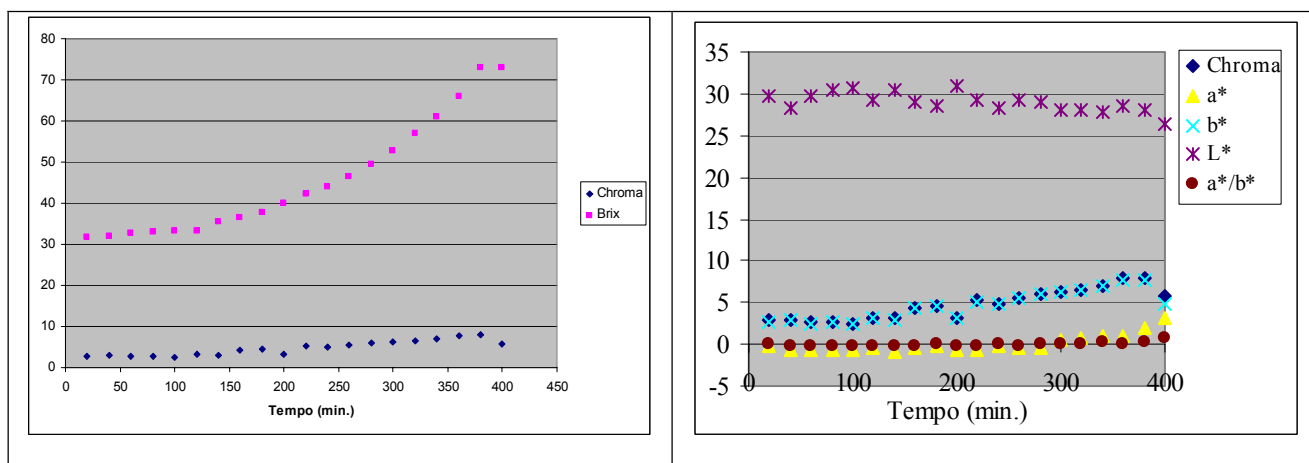
### 3. Resultados e discussão

O diagrama de fluxo correspondente ao processo de produção da água mel encontra-se representado na Fig. 1, que se dividiu em várias passos. Inicialmente lavou-se todo o material utilizado na cresta do mel e adicionou-se à cera que se retirou dos quadros, com água em ebulição. Utilizando um filtro de malha fina, em aço inoxidável separou-se a solução aquosa da cera. Esta cera, após remoção será reutilizada no fabrico de novos quadros para as colmeias. A solução obtida foi colocada a ferver durante cerca de 6 horas até que o teor em sólidos solúveis totais atingiu os 73 °Brix. O produto foi colocado a arrefecer até atingir a temperatura ambiente; posteriormente procedeu-se à trasfega para frascos de vidro, com tampa metálica, ou de plástico, adequadas à embalagem de alimentos para o consumo humano. O armazenamento da água mel foi realizado à temperatura ambiente em local seco.



**Figura 1-** Diagrama de fluxo correspondente ao processo de produção da água mel

Na figura 2 pode ser observada a variação nos valores dos parâmetros experimentais atrás especificados, durante o processo de fabrico de água mel. De uma análise dos mesmos, verificou-se que, particularmente no caso do teor em sólidos solúveis totais (°Brix), HMF,  $b^*$  e Chroma ( $C^*$ ), os valores sofreram um aumento ao longo do tempo, o qual podia ser dividido em duas fases: uma primeira, correspondente aos primeiros 80 a 100 minutos; e uma segunda, consistindo no remanescente do tempo de processamento (400 min.), tendo-se mantido constantes durante o processo de arrefecimento. Para os restantes parâmetros, com excepção da luminosidade ( $L^*$ ), observou-se um aumento sistemático e contínuo ao longo do tempo. Foi ainda efectuado um estudo da determinação das constantes de velocidade das reacções referentes aos diferentes parâmetros estudados, encontrando-se os valores obtidos representados na Tabela 1.



**Figura 2 e 3 -** Variação do °Brix, teor de HMF e parâmetros da cor.

**Tabela 1:** Equações de cinética da variação térmica de alguns parâmetros determinados no decurso da produção de água mel

| Parâmetro | Fase           | k (min <sup>-1</sup> ) | R     |
|-----------|----------------|------------------------|-------|
| °Brix     | 1 <sup>a</sup> | 0,0003                 | 0,978 |
|           | 2 <sup>a</sup> | 0,0013                 | 0,993 |
| L*        | 1 <sup>a</sup> | 0,0002                 | 0,731 |
|           | 2 <sup>a</sup> | -0,0001                | 0,779 |
| a*        | 1 <sup>a</sup> | 0,0078                 | 0,971 |
| b*        | 1 <sup>a</sup> | -0,0008                | 0,798 |
|           | 2 <sup>a</sup> | 0,0016                 | 0,929 |
| a*/b*     | 1 <sup>a</sup> | 0,0055                 | 0,917 |
| HMF       | 1 <sup>a</sup> | 0,0066                 | 0,993 |
|           | 2 <sup>a</sup> | 0,0068                 | 0,992 |

Realizou-se também uma análise de correlação bivariada, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Verificou-se a existência de relações positivas entre o °Brix e o HMF, o °Brix e o tempo, o °Brix e o a\*, o HMF e o a\*, o HMF e o a\*/b\*, o C\* e o b\* e o C\* e o tempo, ou seja sempre que um dos parâmetros aumenta o outro também vai aumentar (Tabela 2).

**Tabela 2:** Correlações entre parâmetros determinados no decurso da produção de água mel

| Parâmetros    | R <sup>2</sup> | N  | Equações                           |
|---------------|----------------|----|------------------------------------|
| ° Brix, HMF   | 0,975          | 17 | $y = 0,0275x^2 - 1,4349x + 17,892$ |
| ° Brix, tempo | 0,947          | 20 | $y = 0,0004x^2 - 0,0249x + 32,605$ |
| ° Brix, a*    | 0,913          | 20 | $y = 0,0714x - 3,2087$             |
| HMF, a*       | 0,949          | 17 | $y = 0,0527x - 0,7185$             |
| HMF, a*/b*    | 0,902          | 17 | $y = 0,0104x - 0,1816$             |
| C*,b*         | 0,993          | 20 | $y = 0,9863x - 0,0534$             |
| C*, tempo     | 0,924          | 20 | $y = 0,0141x + 1,7776$             |

#### 4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que, no final do processo de produção, a água mel apresentava valores de 73 °Brix; 60,41 mg de HMF por kg ; 3,26 de a\*; 4,79 de b\*; 0,68 de a\*/b\*; 5,79 de C\* e 26,30 de luminosidade. O teor de HMF apresentou valores superiores aos contemplados pela legislação nacional e europeia para qualidade de méis produzidos em Portugal - respectivamente 60,4 e 40 mg kg<sup>-1</sup> (4, 5 e 6). Por conseguinte, é recomendável que, para as condições experimentais descritas, o processo de preparação de água mel seja terminado ao fim de 6 horas.

#### 5. Referências Bibliográficas

1. Swallow, K. W.; Low, N. H. Determination of honey authenticity by anion-exchange liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **77** (1994) 695-702.
2. Kueuk M. , Kolayli S. ,Karaoglu S., Ulusoy E. Baltaci C., Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry* xxx (2005) xxx-xxx
3. Vázquez, L.; Verdú, A.; Miquel, A.; Burló, F.; Carbonell-Barrachina, A.A. Changes in physico-chemical properties, hydroxymethylfurfural and volatile compounds during concentration of honey and sugars in Alicante and Jijona *turrón*. *Eur Food Res Technol*, DOI 10.1007/s00217-006-0479-6. (2006).
4. European Union Directive. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*, L10, pp.47-52. (2002).
5. Diário da República. Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, I Série-A, nº 216, 6057-6060.
6. Fallico, B.; Zappalà, M.; Arena, E.; Verzera, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry* **85** (2004) 305-313.

# DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM DIFERENTES VARIEDADES E TIPOS COMERCIAIS DE ARROZ

*Feliciano, R. <sup>\*,1,2</sup>, Trigo., M.J. <sup>4</sup>, Brites, C. <sup>4</sup>, Bronze, M.R. <sup>1,2,3</sup>*

1. Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901. Oeiras, Portugal
2. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras, Portugal,
3. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019, Lisboa, Portugal, [mrbronze@ff.ul.pt](mailto:mrbronze@ff.ul.pt)
4. INIAP, Estação Agronómica Nacional, DTPA, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

Tel +351-214469772, Fax+351-214417062 email:[rodrigof@itqb.unl.pt](mailto:rodrigof@itqb.unl.pt)

**Palavras-chave:** arroz, aromático, 2-acetil-1-pirrolina, compostos voláteis

## Resumo:

As variedades aromáticas de arroz são caracterizadas essencialmente pela presença de 2-acetil-1-pirrolina (2-AP) e podem ser consideradas dois tipos: Jasmim de origem tailandesa e Basmati de origem indiana. A expressão destas variedades no mercado português tem vindo a aumentar nos últimos anos.

Neste trabalho foram analisadas variedades de arroz de origem nacional (Gládio, Glutinoso, Euro Mondego, Ariete, Ariete Vale do Mondego) e externa (Thaibonnet vaporizado, Suriname, Basmati e Thai jasmim). Como técnica de análise utilizou-se a cromatografia gasosa (GC) associada a espectrometria de massa (MS) com preparação da amostra por microextração em fase sólida (SPME). Os resultados obtidos mostram que as variedades aromáticas apresentam uma composição química mais complexa pelo número de compostos presentes e respectiva concentração.

Após optimização das condições de detecção da 2-AP em modo de detecção de ião único (SIM), apenas nas variedades mais aromáticas (Basmati e Thai) foi detectado um pico correspondente a este composto, não se tendo efectuado a sua quantificação.

Entre os compostos identificados, foram seleccionados aqueles que apresentam limiares de detecção mais baixo de acordo com dados bibliográficos e que por isso são relevantes do ponto de vista sensorial para estas amostras, nomeadamente aldeídos saturados, insaturados e aromáticos, álcoois e furanos. A proporção relativa de cada um destes compostos foi comparada nas diferentes variedades.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz é importante na dieta da população portuguesa pois corresponde a um consumo de 15 Kg/per capita [1]. A gastronomia tradicional utiliza o grão do tipo carolino (sub-espécie *Japonica*), cuja especificidade do aroma e da textura assumem particular importância para a definição de zonas IGP (Indicação Geográfica Protegida) em Portugal.

As variedades aromáticas são caracterizadas pelo seu aroma mais pronunciado e atingem preços bastantes superiores no mercado. Essencialmente, existem dois tipos de variedades aromáticas que são função da zona geográfica de origem: Jasmim (Tailândia) e Basmati (Índia).

O aroma característico das variedades aromáticas de arroz é devido a um composto heterocíclico de azoto: 2-acetil-1-pirrolina (2-AP) que possui um limiar de detecção baixo (0,1 ppb em água) [2] e que se caracteriza pelo cheiro a pipocas.

A fracção volátil do arroz abrange também outros compostos, nomeadamente, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, compostos aromáticos, azotados e também terpenos como o limoneno [3].

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Foram analisadas amostras de arroz Gládio, Glutinoso, Euro Mondego, Ariete, Ariete Vale do Mondego, Thaibonnet vaporizado, Suriname, Basmati triple lion, Basmati Saludões e Thai jasmim.

### 2.1. Preparação de amostras para análise por GC-MS

A amostra foi preparada de acordo com procedimento anteriormente descrito [4]. As amostras foram pesadas (0.25g) para um frasco com tampa no interior do qual foi colocado um agitador magnético. Foram adicionados 500 µl de água Milli-Q a cada uma das amostras em estudo e procedeu-se ao seu aquecimento a 80°C durante 25 minutos. Para a concentração dos compostos foi usada uma fibra de DVB/CAR/PDMS (50/30 µm com 2 cm de comprimento) exposta à fracção de espaço de cabeça em equilíbrio com a amostra durante 5 minutos.

### 2.2. Condições de análise em GC-MS

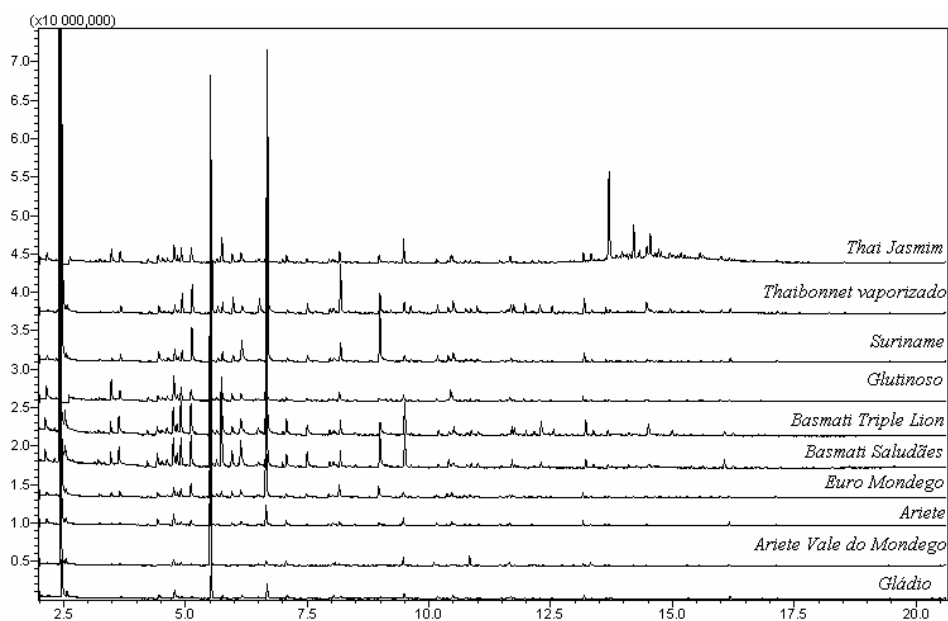
Os compostos voláteis foram analisados num cromatógrafo gasoso (GC-2010, *Shimadzu*) acoplado a um espectrómetro de massa (GCMS-QP2010, *Shimadzu*) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (*J&W*) de 30m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme com fase estacionário de polidimetilsiloxano.

Após concentração da amostra a fibra foi introduzida no injecto (270°C) durante 3 minutos quer em modo splitless quer em modo split (1:5 ou 1:20). A velocidade do fluxo de purga era de 3 ml/min. O programa de temperatura iniciou-se com uma temperatura inicial de 50°C durante 1 minuto e depois sofreu um incremento de 10°C/min até atingir 250°C, temperatura à qual permaneceu durante 9 minutos. A temperatura da fonte iónica era de 250°C e os espectros de massa obtidos por impacto de electrões (EI) foram adquiridos em full scan no intervalo  $m/z=30-350$ . A pesquisa de 2-AP foi efectuada em modo SIM ( $m/z=43, 68, 69$  e  $111$ ). A identificação dos compostos foi efectuada por comparação do espectro de massa com os espectros nas bibliotecas Wiley 229, NIST 12, 27 e 147.

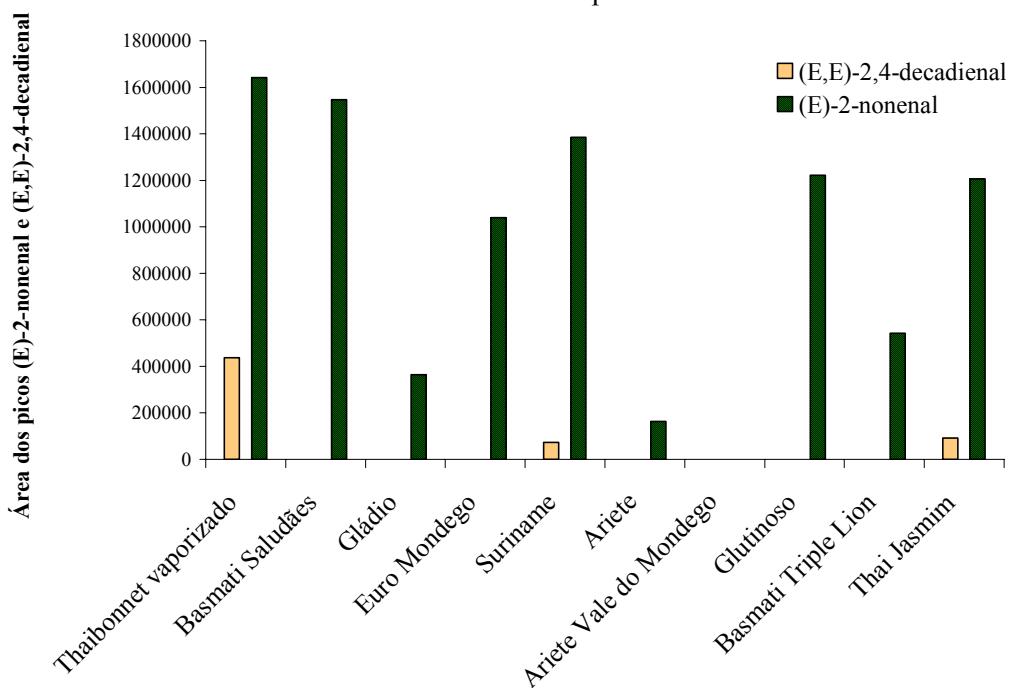
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram comparados os perfis cromatográficos obtidos por GC-MS (ver figura 1) para as várias amostras em estudo tendo em conta os compostos que apresentam limiares de detecção mais baixo de acordo com dados bibliográficos [3]. Assim foram seleccionados os aldeídos saturados (hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal), aldeídos insaturados ((E)-2-heptenal, (E)-2-nonenal, (E)-2-decenal, (E,E)-2,4-decadienal) aldeídos aromáticos (benzaldeído), álcoois (hexanol), furanos (2-pentilfurano) e pirrolinas (2-AP). Verificou-se que comparativamente, a amostra Thaibonnet vaporizado possui maior concentração de octanal, nonanal, (E)-2-nonenal, decenal e (E,E)-2,4-decadienal), a amostra Thai Jasmim possui maior teor de hexanal e hexanol, a amostra Glutinoso exibe um teor superior de heptanal, benzaldeído, 2-pentilfurano e a amostra Suriname detém concentrações superiores de (E)-2-heptenal e (E)-2-decenal).

O número de compostos detectados em cada amostra variou e nas variedades com perfis cromatográficos mais complexos (ver figura 2) como por exemplo, arroz Thai Jasmim foram identificados cerca de 90 compostos. Dos compostos voláteis geralmente descritos no arroz como apresentando um menor limiar de detecção salienta-se o (E,E)-2,4-decadienal (0,07 ppb [3]) que apenas foi detectado nas variedades Thaibonnet vaporizado, Thai Jasmim e Suriname enquanto que o (E)-2-nonenal (0,08 ppb [3]) é detectado em praticamente todas as amostras exceptuando a variedade Ariete Vale do Mondego na qual não foi detectado e as variedades Gládio e Ariete que apresentam teores bastante inferiores comparativamente às restantes amostras.

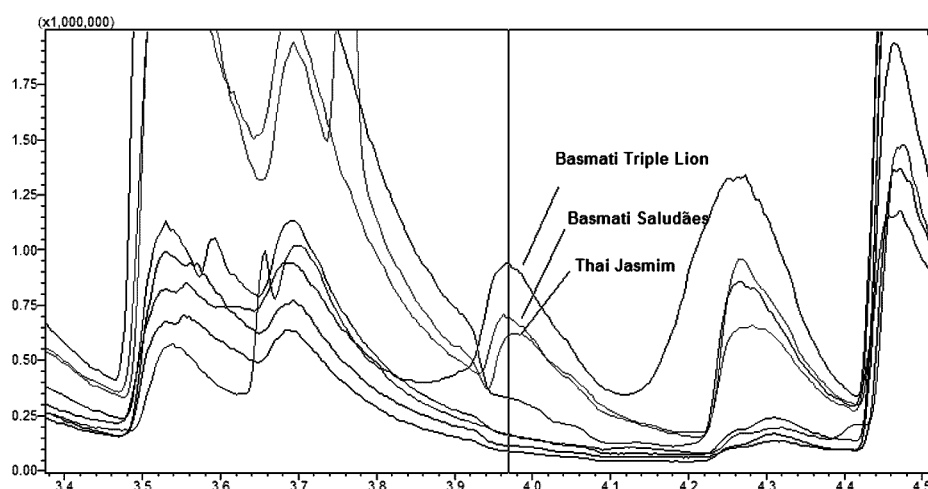


**Figura 1-** Comparação do perfil de corrente iónica total (CIT) das 10 variedades de arroz analisadas por GC-MS



**Figura 2-** Comparação da área correspondente ao pico do (E,E)-2,4-decadienal e (E)-2-nonenal presentes nas amostras de arroz analisadas por GC-MS

A 2-AP apresenta também um limiar de detecção baixo (0,1 ppb [2]) mas apenas foi possível ser identificada, nas três amostras habitualmente reconhecidas como variedades aromáticas: Thai Jasmim, Basmati Saludães e Basmati Triple Lion (ver figura 3).



**Figura 3**-Perfis de CIT para os iões extraídos 43+68+69+83+111 típicos do composto 2-AP, nas amostras de arroz analisadas por GC-MS

Trabalhos futuros deverão ser realizados no sentido de confirmar estas diferenças e correlacionar os dados obtidos instrumentalmente com os resultados obtidos na avaliação sensorial destas amostras.

#### **Agradecimentos**

Este trabalho enquadra-se no projecto PIDDAC 114/04 da EAN- Identificação das características diferenciadoras de variedades nacionais de arroz, através de parâmetros químicos e reológicos, indicadores da qualidade culinária e nutricional.

#### **Referências**

- [1] Brites, C. *et al*, O arroz carolino, uma jóia da nossa gastronomia, COTArroz, 31, 2006
- [2] Sriseadka, T., *et al*, Journal of Agric. and Food Chem., 52 (21), 2006
- [3] Turnbaugh, J.G., *et al*, Journal of Agric. and Food Chem., 36 (5), 1988
- [4] Grimm, Casey C, *et al*, Journal of Agric. and Food Chem., 49, 2001



# DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO TEOR DE POLIFENÓIS NO CHÁ VERDE DA GORREANA: IMPACTO ECONÓMICO

*Baptista, J.\* , Lima, E.\* , Castro, A.R.*

Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento (DCTD)  
Rua da Mãe de Deus, 9501-801 Ponta Delgada, S. Miguel, Açores, Portugal

\* Tel +351-296 650 172 Fax +351-296 650 171 e-mail: [elis@notes.uac.pt](mailto:elis@notes.uac.pt) ou [baptista@notes.uac.pt](mailto:baptista@notes.uac.pt)

**Palavras-chave:** chá verde, polifenóis, catequinas, RP-HPLC

**Resumo:** Estudo do aproveitamento comercial das catequinas do chá verde dos Açores (Gorreana), durante a época não destinada à sua colheita normal, através da técnica de RP-HPLC.

## 1. INTRODUÇÃO

A planta da *Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze, uma espécie da família das Teáceas, originária do Sudeste da China, expandiu-se para cerca de 30 países e, desde o século XIX, é também cultivada num único local da Europa – S. Miguel, Açores. Esta planta, possuindo raízes relativamente finas, necessita de muita água e humidade, sobretudo na fase de florescimento. Uma humidade relativa acima dos 60-70%, juntamente com o solo fértil a um pH entre o neutro e ácido (7 a 4.5), confere à Ilha de S. Miguel condições ideais para o crescimento desta planta e para a produção do respectivo chá com características próprias. O chá da *C. sinensis* é, provavelmente, a bebida mais comum em todo o mundo e a sua popularidade pode ser atribuída às suas propriedades organolépticas, ao seu baixo custo, aos seus efeitos estimulantes e, sobretudo, aos potenciais efeitos benéficos para a saúde humana dos seus polifenóis, tais como as actividades antioxidante [1,2], antibacteriana, anticariogénica [3], hipocolesterolémica [4], anticarcinogénica [5,6] e reguladora da tensão arterial [7].

O chá verde dos Açores (Gorreana) apresenta o valor mais elevado de derivados das catequinas, e particularmente da epigallocatequina-3-galato (EGCG), e a mais baixa concentração de cafeína (a concentração de cafeína varia com a origem da folha, o tipo de solo e condições de processamento), em comparação com os chás das outras origens (China, Japão, Coreia e Ilha Formosa-Taiwan), o que revela o seu elevado valor como um nutracêutico, com grande potencial na prevenção de algumas doenças mais degenerativas [8,9,10].

O objectivo do nosso estudo foi a quantificação dos polifenóis (derivados da epicatequina) do chá verde dos Açores (Gorreana) de colheitas feitas durante o período “Setembro 2005 – Abril 2006”, tendo em vista o estudo da viabilidade da sua exploração comercial nesse período.

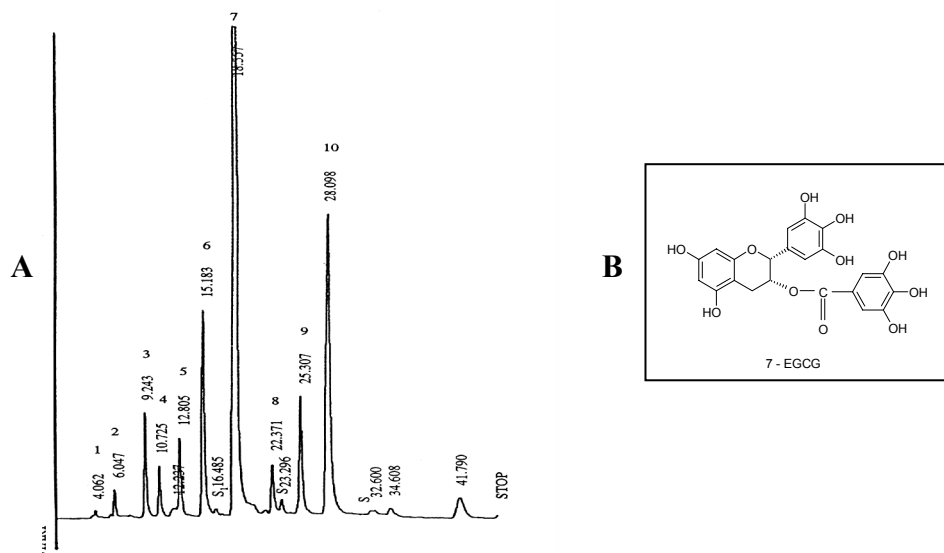
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas secas de chá verde foram fornecidas pela Fábrica de Chá Gorreana e são referentes aos meses de Setembro a Dezembro de 2005 e a Abril de 2006.

Os polifenóis de cada amostra (100 mg) foram extraídos com água bidestilada, durante 30 minutos, à temperatura de 70 °C, debaixo de uma atmosfera de azoto. Após partição da solução aquosa com clorofórmio, os polifenóis presentes na camada aquosa foram extraídos com acetato de etilo. A cafeína foi extraída pelo método de Fernandez *et al.* (2000) [11].

Na separação dos polifenóis (catequinas) do chá verde da Gorreana foi desenvolvida uma metodologia por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), usando uma coluna de fase reversa, Spherisorb ODS 2-3 µm (100 mm x 4.6 mm d.i.), e uma fase móvel constituída por fase (A) – 0.1% ácido ortofosfórico:acetoneitrilo:acetato de etilo (89.5:8.5:2, v/v/v) e fase (B) –

acetone:água (1:1, v/v), mantendo 100% fase (A) durante os primeiros 5 min seguida de um gradiente linear atingindo 20% fase (B) ao fim de 20 min. A detecção foi feita por espectroscopia de ultravioleta (280 nm) (Figura 1).



**Figura 1** – A. Cromatograma de uma amostra de chá verde Gorreana (separação das catequinas). Legenda: **1** – ácido gálico (AG); **2** – (+) galocatequina (GC); **3** – (-) epigalocatequina (EGC); **4** – (+) catequina (C); **5** – cafeína (CAF); **6** – (-) epicatequina (EC); **7** – (-) epigalocatequina-3-galato (EGCG); **8** – ácido p-coumárico; **9** – (-) galocatequina-3-galato (GCG); **10** – (-) epicatequina-3-galato (ECG). B. Estrutura molecular da EGCG

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

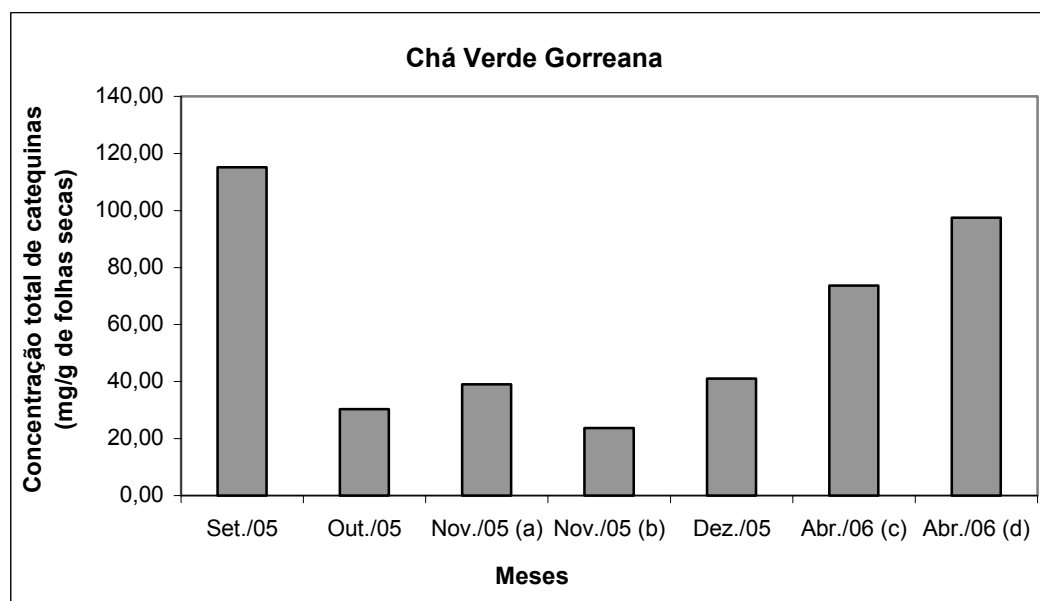
A separação e quantificação dos polifenóis (catequinas e seus derivados) do chá verde dos Açores (Gorreana), colhido durante o período “Setembro 2005 – Abril 2006”, foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão, usando uma coluna de fase reversa (RP-HPLC) (ver Figura 1). Conforme apresentado na Tabela 1, o total de derivados da epicatequina (DECs) variou, durante o período acima referido, de 23.72 mg/g até 115.12 mg/g de peso de folha seca, apresentando um mínimo no mês de Novembro e um máximo no mês de Setembro. Os meses com os teores mais baixos de DECs foram Outubro, Novembro e Dezembro. Na mistura de DECs, o epigalocatequina-3-galato (EGCG) foi o maior constituinte, oscilando entre 10.43 mg/g (Nov. 05) e 42.08 mg/g (Set. 05) de peso de folha seca. Não foram determinados os teores dos DECs nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março por ausência de amostras (possivelmente o período em que as folhas são destinadas a compostagem para serem usadas como fertilizante natural).

A Figura 2 ilustra a concentração total das catequinas/mês durante o período de estudo (Set. 05 a Abril 06) e a Figura 3 a comparação das diferentes catequinas em cada mês do mesmo período.

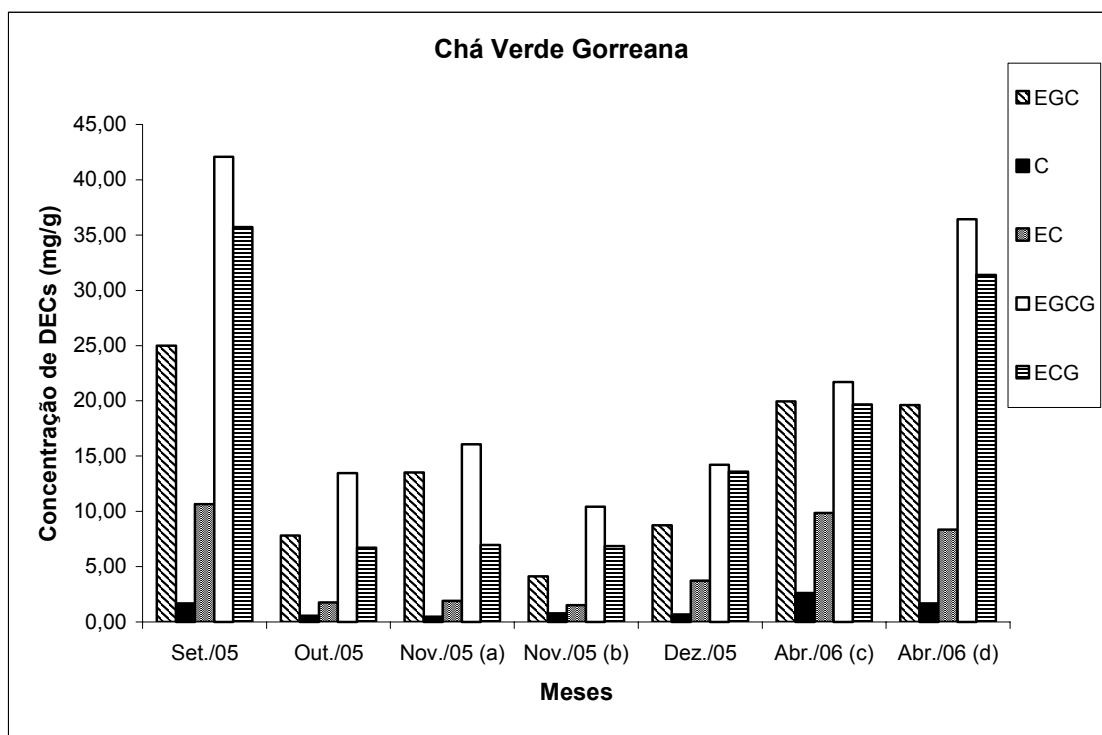
**Tabela 1** – Concentração dos derivados da epicatequina (DECs) em mg/g de folhas secas no Chá Verde Gorreana. (a) Folhas nascidas a Jul.-Ago./05 e colhidas em Nov./05. (b) Folhas nascidas na 1ª quinzena de Set./05 e colhidas em Nov./05. (c) Folhas nascidas depois de Jan./06 e colhidas a 24/04/06. (d) Folhas nascidas depois de 22/03/06 e colhidas a 26/04/06. (e) Média do total de DECs durante o período Set.05 a Abr.06 = 60.04%. (f) Concentração de cafeína retida, depois de

parcialmente removida com a extracção líquido/líquido (clorofórmio/água), equivalente a uma redução de cerca de 90-95%. **EGC** – epigallocatequina; **C** – catequina; **EC** – epicatequina; **EGCG** – epigallocatequina-3-galato; **ECG** – epicatequina-3-galato

| Meses              | EGC        | C         | EC         | EGCG       | ECG        | Total de DECs (e) | Cafeína (f) |
|--------------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-------------------|-------------|
| <b>Set./05</b>     | 24.98±1.00 | 1.68±0.07 | 10.65±0.43 | 42.08±1.68 | 35.73±1.43 | 115.12±4.61       | 0.68±0.03   |
| <b>Out./05</b>     | 7.80±0.31  | 0.58±0.02 | 1.78±0.07  | 13.45±0.54 | 6.73±0.23  | 30.34±1.17        | 0.18±0.01   |
| <b>Nov./05 (a)</b> | 13.53±0.54 | 0.48±0.02 | 1.93±0.08  | 16.08±0.64 | 6.98±0.28  | 39.00±1.56        | 0.20±0.01   |
| <b>Nov./05 (b)</b> | 4.13±0.17  | 0.78±0.03 | 1.53±0.06  | 10.43±0.42 | 6.85±0.27  | 23.72±0.95        | 0.25±0.01   |
| <b>Dez./05</b>     | 8.75±0.35  | 0.68±0.03 | 3.75±0.15  | 14.23±0.57 | 13.60±0.54 | 41.01±1.64        | 0.40±0.02   |
| <b>Abr./06 (c)</b> | 19.95±0.80 | 2.40±0.10 | 9.88±0.40  | 21.70±0.84 | 19.68±0.79 | 73.61±2.93        | 0.93±0.04   |
| <b>Abr./06 (d)</b> | 19.63±0.79 | 1.70±0.07 | 8.35±0.33  | 36.43±1.46 | 31.40±1.26 | 97.51±3.91        | 0.98±0.04   |



**Figura 2** – Concentração total das catequinas no Chá Verde Gorreana. **(a)** Folhas nascidas a Jul./Ago./05 e colhidas em Nov./05. **(b)** Folhas nascidas na 1ª quinzena de Set./05 e colhidas em Nov./05. **(c)** Folhas nascidas depois de Jan./06 e colhidas a 24/04/06. **(d)** Folhas nascidas depois de 22/03/06 e colhidas a 26/04/06



**Figura 3** – Concentração dos derivados da epicatequina (DECs) no Chá Verde Gorreana. **(a)** Folhas nascidas a Jul.-Ago./05 e colhidas em Nov./05. **(b)** Folhas nascidas na 1ª quinzena de Set./05 e colhidas em Nov./05. **(c)** Folhas nascidas depois de Jan./06 e colhidas a 24/04/06. **(d)** Folhas nascidas depois de 22/03/06 e colhidas a 26/04/06. EGC – epigalocatequina; C – catequina; EC – epicatequina; EGCG – epigalocatequina-3-galato; ECG – epicatequina-3-galato

O estudo do efeito da temperatura, no rendimento do processo de extração, mostrou que a concentração de EGCG aumenta com o aumento da temperatura desde 50 °C, alcançando o valor máximo aos 70 °C e decresce com o aumento de temperatura no intervalo de 70 °C-100 °C. A influência do tempo de extração à temperatura de 70 °C no rendimento desta foi determinada, tendo-se verificado um aumento desigual para as concentrações das várias catequinas, provavelmente devido a diferenças de hidrofobicidade e/ou efeitos sinérgicos ou antagónicos entre os diferentes componentes do licor do chá, alcançando-se o valor máximo ao fim de 30-40 min. A eficiência do processo de extração, investigada em quatro determinações sucessivas, apresentou um rendimento que variou de 90% (EC, ECG e cafeína) até 100% para as outras catequinas. A repetibilidade dos resultados analíticos, nas condições experimentais usadas, apresentou um coeficiente de variação inferior a 4% nas determinações quantitativas e inferior a 0.6% para os tempos de retenção.

#### 4. CONCLUSÕES

O chá da *Camelia sinensis* é uma das bebidas mais populares consumidas em certas partes do Globo.

A metodologia de HPLC, usada neste estudo, permitiu a determinação dos polifenóis (catequinas) do chá verde da Gorreana colhido durante o período “Setembro 2005 – Abril 2006”. A composição polifenólica do chá verde dos Açores (Gorreana) reflecte a influência da sua origem geográfica, do clima, da variedade da planta (híbrido), do tipo de solo

(vulcânico), dos materiais de suporte (nutrientes orgânicos) durante o crescimento da planta, e das diferentes técnicas hortícolas e de processamento. O teor de polifenóis (catequinas) durante os meses de Setembro a Dezembro é cerca de 20-30% do teor dos mesmos nos meses de Primavera e Verão.

O aproveitamento comercial dos polifenóis (derivados da epicatequina – DEC) do chá verde da Gorreana, durante a época não destinada à sua colheita normal, tendo em vista o uso das suas propriedades antioxidantes (adição a cosméticos e a produtos alimentares, etc.), dependerá da quantidade (peso total) de folhas secas recolhidas durante esse período e do custo da mão-de-obra envolvida no processo de extracção. Numa primeira aproximação, poderemos estimar que por cada tonelada de folhas secas será possível extrair cerca de (60 mg/g – valor médio) 60 Kg de polifenóis (DEC).

### Agradecimentos

Este trabalho foi suportado por fundos da Direcção Regional de Comércio, Indústria e Energia – Secretaria da Economia do Governo Regional dos Açores.

### Referências

- [1]– C.T. HO, T. Osawa, M.T. Huang, R.T. Rosen (eds.) – *Food phytochemicals for cancer prevention*, vol. II, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 34-50 (1994)
- [2]– G.C. Yen, H.Y. Chen – Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agr. Food Chem.* **43** (1995) 27-32
- [3]– S. Sakanaka, M. Kim, M. Taniguchi, T. Yamamoto – Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium, *Agr. Biol. Chem.* **53** (1989) 2307-2311
- [4]– T.T.C. Yang, M.W.L. Koo – Hypocholesterolemic effects of Chinese tea, *Pharmacol. Res.* **35** (1997) 505-512
- [5]– H. Fujiki, M. Suganuma, S. Okabe, N. Sueoka, A. Komori, E. Sueoka, T. Kozu, Y. Tada, K. Suga, K. Imai, K. Nakachi – Cancer inhibition by green tea, *Mutat. Res.* **402** (1998) 307-310
- [6]– J. Jankun, S.H. Selman, R. Swiercz – Why dinking green tea could prevent cancer, *Nature* **387** (1997) 561
- [7]– Y. Hara, T. Matsuzaki, T. Suzuki – Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **61** (1987) 803-808
- [8]– J.A.B. Baptista, J.F.P. Tavares – Tea Phytochemicals Review. Determination of Azorean Green Tea Prophylatic Compounds, *Açoreana* **8** (1998) 531-543
- [9]– J.A.B. Baptista, J.F.P. Tavares, R.C.B. Carvalho – Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC, *Food Res. Int.* **31** (1999) 729-736
- [10]– J.A.B. Baptista, J.F.P. Tavares, R.C.B. Carvalho – Comparative Study and Partial Characterization of Azorean Green Tea Polyphenols, *J. Food Comp. Anal.* **12** (1999) 273-287
- [11]– P.L. Fernandez, M.J. Martin, A.G. Gonzalez, F. Pablos – HPLC determination of catechin and caffeine in the tea. Differentiation of green, black and instant teas, *Analyst* **125** (2000) 421-425

## CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE AZEITES ELEMENTARES DA REGIÃO DE TRÁS-OS-MONTES

*Sousa<sup>1</sup>, A.; Casal<sup>2</sup>, S.; Frederico<sup>1</sup>, C.; Cosme<sup>1</sup>, V.; Bento<sup>1</sup>, A.; Oliveira<sup>2</sup>, B.; Pereira<sup>1\*</sup>, J.A.*

<sup>1</sup>CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

<sup>2</sup>REQUIMTE/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal.

\* jpereira@ipb.pt

Trás-os-Montes é uma das principais regiões produtoras de azeite a nível nacional, onde é produzido azeite com a Denominação de Origem Protegida “Azeite de Trás-os-Montes”. De uma forma geral, estes azeites resultam de uma mistura de diferentes cultivares, maioritariamente Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana, sendo permitida a presença de outras, ainda que em menor proporção.

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para a caracterização química de azeites elementares produzidos na região de Trás-os-Montes. Assim, foram analisadas 80 amostras de azeite das cultivares Cobrançosa (20), Verdeal Transmontana (11), Madural (11), Santulhana (11), Negrinha de Freixo (11), Cordovil (10), Borrenta (2), Bical (1), Cordovesa (1), Lentisca (1) e Madural Negra (1), num total de 11 cultivares, tendo sido caracterizados no que respeita à acidez, índice de peróxidos, absorvência no ultravioleta, teor em clorofilas e carotenóides e composição em ácidos gordos.

Os resultados obtidos mostraram que todas as cultivares produzem azeites com baixa acidez (sempre inferior a 0,5%), índice de peróxido e absorvência no ultravioleta dentro dos parâmetros permitidos na legislação para azeite virgem extra e teores em clorofilas e carotenóides dependentes da maturação das azeitonas à colheita. A composição em ácidos gordos foi diferente de acordo com as amostras em análise sendo que as Cv. Verdeal Transmontana, Negrinha de Freixo e Lentisca apresentaram os teores mais elevados em ácidos gordos monoinsaturados, superiores a 80%, e mais baixos em ácidos gordos polinsaturados, enquanto a Cv. Madural Negra apresentou o teor mais baixo (70%) em ácidos gordos monoinsaturados e dos mais elevados em polinsaturados (13%). Nas amostras em estudo o teor em ácidos gordos saturados variou entre 12 e 17% enquanto o teor em isómeros *trans*, com a excepção de uma amostra, foi inferior a 0,7%.

O presente trabalho foi parcialmente financiado pelo projecto AGRO nº 482 “Protecção contra pragas do olival numa óptica de defesa do ambiente e do consumidor”.

# EFEITO DA *ESTUFAGEM* NA COMPOSIÇÃO DO VINHO MADEIRA

*Pereira, V.\*; Pontes, M., Paixão N.; Câmara, J.S.; Marques, J.C.*

Centro de Química da Madeira, Departamento de Química da Universidade da Madeira, Campus da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal.

Tel +351-291 705 100 Fax +351-291 705 149 \*e-mail: vpereira@uma.pt

**Palavras-chave:** Vinho Madeira, *estufagem*, aminoácidos, furanos.

**Resumo:** O vinho Madeira é um produto tradicional com um processo único de envelhecimento, que inclui um aquecimento até cerca de 45 °C, durante cerca de 3 meses. Este procedimento, conhecido por *estufagem*, desempenha um papel fundamental na sua qualidade e longevidade. Neste seguimento, foi desenvolvido um sistema piloto capaz de simular a *estufagem* industrial. Estudou-se então o efeito da *estufagem* nos compostos voláteis, nomeadamente os furanos, relacionando-os com o teor de aminoácidos presentes nos vinhos provenientes de uma casta tipicamente produtora de vinho Madeira, estufados a três temperaturas diferentes, 30, 45 e 55 °C e processados por dois métodos distintos, método Moderno e Tradicional. Para tal, começou-se por fazer a caracterização geral, através da análise dos extractos em DCM por GC-MS, de 12 vinhos Tinta Negra Mole *estufados* durante 4 meses, integrado no âmbito do projecto IMPACT. Após esta etapa passou-se ao estudo dos aminoácidos e furanos por HPLC. Deste estudo pôde-se concluir que de entre os compostos que evoluem com a *estufagem* é o HMF que mais se destaca, especialmente à temperatura de 55°C, assim como a arginina revelou ser o aminoácido que mais decresce. Os vinhos *estufados* também mostraram ser ricos em succinato de mono e dietilo e 3-hidroxihexanoato de etilo.

## 1. INTRODUÇÃO

Os aromas do vinho Madeira que são desenvolvidos durante a *estufagem* decorrem dum conjunto de reacções químicas e enzimáticas que o modificam e caracterizam, nomeadamente, os aromas que resultam da reacção de Maillard (RM) e da degradação dos açúcares por aquecimento em meio ácido. Estas reacções originam principalmente 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (F), e outros que repercutem aromas típicos do tratamento térmico sofrido por vinhos fortificados, produzidos em condições de arejamento restritas <sup>[1]</sup>.

A RM resulta geralmente da reacção inicial de um açúcar redutor com um aminoácido, seguida por uma cascata de reacções consecutivas e paralelas. Os produtos variam desde aromas voláteis a melanoidinas (compostos acastanhados) <sup>[2]</sup>. Neste ponto de vista a determinação dos aminoácidos torna-se importante, assim como devido ao papel fundamental que desempenham na dieta alimentar e por serem precursores de compostos aromáticos responsáveis pelo *bouquet* do vinho.

O interesse para o controlo dos compostos furânicos no vinho Madeira deve-se ao facto dos vinhos doces possuírem teores elevados em hidratos de carbono e serem submetidos a um longo período de aquecimento (acima de 3 meses). Assim, pode ser assumido que os teores em furanos podem atingir níveis onde o *bouquet* do vinho poderá ser afectado. O HMF e o F são os principais produtos de degradação da hidrólise de hexoses e pentoses, respectivamente. O HMF tem sido relacionado com as alterações na cor dos produtos alimentares enquanto que o F é aceite como indicador de alterações no aroma. Têm sido usados como potenciais indicadores de temperatura abusiva e duração de armazenamento inadequada, em diferentes produtos alimentares, entre os quais vinhos envelhecidos em barris e vinhos fortificados. Nos

últimos anos, a presença de HMF e F nos alimentos tem suscitado interesses toxicológicos. Alguns investigadores assumem que estes compostos não são considerados perigosos para a saúde humana quando usados como ingredientes aromáticos <sup>[3,4]</sup>.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Amostras

Foram analisadas 6 amostras de vinho doce e 6 amostras de vinho seco da casta Tinta Negra Mole, processados por dois métodos distintos, método Moderno e Tradicional e estufados durante 4 meses, a 30, 45 e 55 °C, integrado no âmbito do projecto IMPACT.

### 2.2 Reagentes

**2.2.1 Voláteis:** padrão interno octan-3-ol (Aldrich, 99 %); solvente de extração diclorometano (DCM) (Merck, 99,8 %); agente secante sulfato de sódio anidro (Riedel-de-Haën, 99 %).

**2.2.2 Aminoácidos:** ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína, asparagina, serina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, valina, metionina, fenilalanina, isoleucina e leucina foram adquiridos à Sigma-Aldrich, >98 % e preparados em ácido clorídrico 0,1 M (Riedel-de-Haën, p.a.), assim como os padrões internos (PI) homoserina e norvalina (Acros Organics, 99 %). Os reagentes de derivatização são o mercaptoetanol (Acros Organics, 99 %), o tetrafenilborato de sódio (Merck, p.a.), IDA (Sigma-Aldrich, p.a.) e OPA (Acros Organics, p.a.), preparados em tampão borato. As fases móveis foram preparadas com hidrogenossulfato de dissódio dihidratado (Merck, p.a.), ácido propiônico (Acros Organics, 99 %), DMS (Lab-Scan, p.a.), ACN (Lab-Scan, HPLC), metanol (Sigma-Aldrich, HPLC) e água ultra-pura.

**2.2.3 Furanos:** padrões analíticos HMF e F (Acros Organics, 98 %). As fases móveis foram preparadas com água ultra-pura, metanol (Sigma-Aldrich, HPLC) e ácido acético (JMGS, 99 %).

### 2.3 Condições cromatográficas

#### 2.3.1 GC-MS – Voláteis

Depois de se obterem os extractos (2 ml de DCM a partir de 10 ml de vinho), injectou-se 1 µl num sistema cromatográfico constituído por um cromatógrafo gasoso Varian STAR 3400 CX equipado com um auto-injector Varian 8200 e um espectrómetro de massa de armadilha de iões Varian Saturn 3. O gás de arraste usado foi o Hélio N60 (ArLiquido) com uma pressão à entrada da coluna de 100kPa (13 Psi), originando um fluxo constante de cerca de 1ml/min. Os voláteis foram separados numa coluna capilar DB-WAXETR (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm) de sílica fundida, J&W Scientific. O injector foi aquecido até 230°C e a temperatura inicial da coluna ajustada para 40 °C, elevando-se 2 °C/min até atingir os 220 °C. Ajustou-se a linha de transferência e a armadilha de iões para 230 e 180 °C, respectivamente. A identificação dos voláteis foi efectuada comparando os espectros de massa obtidos com os da biblioteca NIST 92.

#### 2.3.2 HPLC

O sistema cromatográfico usado foi da Waters, equipado com um Autoinjector Plus 717, uma bomba binária 1525, detector de fotodiodo de varimento 996, detector de fluorescência 470. A coluna usada foi a Nova-Pak C<sub>18</sub> 150 mm × 3.9 mm × 4 µm.



### 2.3.2.1 Aminoácidos

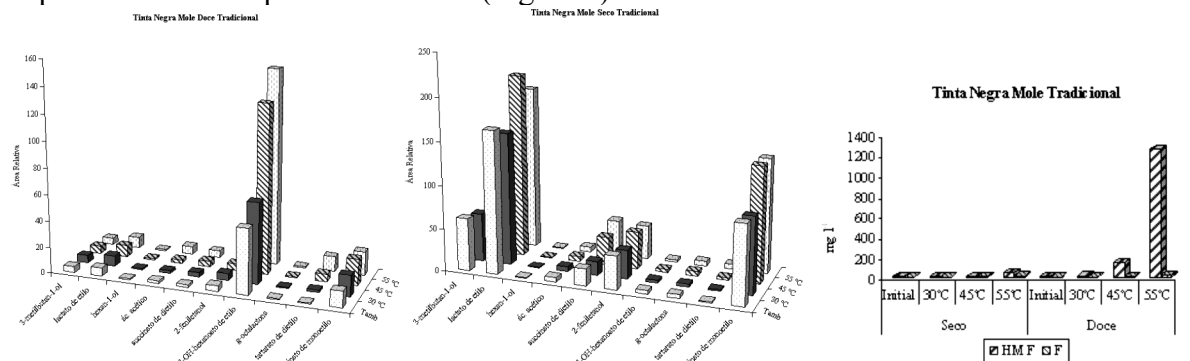
A derivatização consistiu na diluição de 50 µl de amostra em 250 µl de ACN, 125 µl da solução PI e 125 µl da solução IDA. Depois de agitação, aguardou-se 3 min até à adição de 125 µl da solução OPA. 20 µl desta mistura foram injectados 3,5 min depois da agitação. Solvente A foi preparado com 57,4 mM de hidrogenossulfato de dissódio, 50 mM de ácido propiónico, 2 % de DMS e 5,5 % de ACN, em água ultra-pura e o solvente B com 33 % de metanol, 7 % de DMS, 40 % de ACN em água. O programa de eluição por gradiente foi: de 95 % A inicial para 90 % A em 2 min, 33 min a 90 % A, para 70 % A em 10 min, 60 % A em 35 min, 20 % A em 30 min mantidos durante 5 min, 95 % A em 3 min mantidos durante 2 min. A detecção foi ajustada para 365 e 445 nm para o c.d.o. de excitação e emissão.

### 2.3.2.2 Furanos

O solvente A foi preparado com água, ácido acético e metanol (80:2:18) e o solvente B foi preparado com os mesmos solventes na proporção 8:2:90. O programa de eluição por gradiente foi: 6 min a 100 % A, para 20 % A em 4 min, 5 min a 20 % A, para 100 % A em 3 min e mantido 100 % A durante 5 min. As amostras de vinho foram previamente filtradas através de um filtro poroso de 0,45 µm. O volume de injeção foi de 10 µl. A velocidade do fluxo da fase móvel foi de 0,50 ml/min. Os dois furanos foram detectados a 280 nm.

## 3. RESULTADOS

Constatou-se que as famílias químicas mais abundantes são os ésteres etílicos, os álcoois superiores e os compostos furânicos (Figura 1).



**Figura 1** – Compostos voláteis maioritários que caracterizam o perfil aromático dos vinhos Tinta Negra Mole Tradicional doce (esquerda) e seco (centro), antes e após a *estufagem* e à direita a comparação dos níveis de HMF e F.

Os álcoois superiores são maioritariamente formados através do anabolismo dos açúcares e em menor quantidade pela degradação dos aminoácidos. Assim como o encontrado por Câmara (2004) os álcoois superiores mais abundantes nos vinhos em estudo são o 3-metilbutan-1-ol e o 2-feniletanol. Participam com uma menor parcela do que os ésteres etílicos de ácidos fixos na composição aromática dos vinhos em estudo, com teores mais elevados em 3-metilbutan-1-ol e por isso podemos deduzir que os mostos que originaram estes vinhos deveriam ser abundantes nos aminoácidos precursores leucina e isoleucina. Os vinhos que foram sujeitos a alguma fermentação são mais ricos nestes voláteis, confirmando que a sua formação é devida maioritariamente à degradação dos açúcares.

De entre os aminoácidos estudados a arginina é o maioritário e mostrou maior consumo durante todo o processo de *estufagem*. Os álcoois superiores não possuem um comportamento regular com a *estufagem*, mas podemos constatar que não evoluem positivamente,

confirmando-se pelo teor de aminoácidos precursores do 3-metilbutan-1-ol e o 2-feniletanol, isoleucina e fenilalanina, que se mantêm quase constantes.

Verificou-se ainda o aumento notório dos teores de succinato de mono e dietilo, 3-hidroxihexanoato de etilo e principalmente dos compostos furânicos, F e HMF, consoante o incremento da temperatura de *estufagem*. Os succinatos mostraram-se superiores nos vinhos secos devido à fermentação ser superior (Figura 1). Este aumento também pode ser explicado devido às reacções de esterificação química entre os álcoois livres e o ácido succínico. O crescimento do 3-hidroxihexanoato de etilo é uma tendência verificada em todos os vinhos à excepção dos vinhos mais fermentados (Figura 1). A presença deste composto nos vinhos que contêm açúcar e a ausência naqueles que não têm, mostra que a sua formação poderá estar interligada aos açúcares, favorecida por temperatura elevadas.

Verificou-se claramente que os furanos crescem ao longo da *estufagem* e com o aumento da temperatura (Figura 1). No que diz respeito aos vinhos doces o Método Tradicional desenvolveu mais furanos, dado que o teor de açúcar é mais elevado. Os vinhos secos desenvolveram menos furanos que os doces por possuírem um teor de açúcar inferior, mas no entanto seguem a mesma tendência.

Uma vez que a RM é favorecida por um pH mais elevado (cerca de 7) do que o do vinho (cerca de 3,5), provavelmente a formação de compostos furânicos em estudo através desta reacção é pouco favorável. No entanto, a RM também é favorecida por temperaturas acima dos 50 °C, o que faz pensar que poderá desempenhar um papel importante na *estufagem* dos vinhos doces a 55°C. Pelo facto dos aminoácidos serem consumidos durante a *estufagem*, especialmente a arginina a 55°C, podemos associar este facto à ocorrência da degradação de Strecker, reacção que ocorre num estado mais avançado da RM. Os aminoácidos também participam no mecanismo de formação de F e HMF, mas actuam como catalisador e por isso não podemos dizer que o seu consumo é devido à formação destes aldeídos.

#### 4. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho pôde-se concluir que os vinhos *estufados* são ricos em ésteres etílicos, álcoois superiores e compostos furânicos. Os compostos que evoluem positivamente são o succinato de mono e dietilo, 3-hidroxihexanoato de etilo e principalmente o HMF. Claramente o HMF cresce ao longo da *estufagem* e com o aumento da temperatura, bem patente na *estufagem* a 55 °C. Para a maior parte dos aminoácidos verificou-se um decréscimo ao longo da *estufagem* enquanto que outros não sofrem alterações significativas.

#### Referências

- [1] – V. Pereira, F. Albuquerque, J. S. Câmara, J. P., J. C. Marques, *Levels of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in Madeira wines – XXIX World Congress of Vine and Wine*, Logroño, Espanha, Junho de 2006.
- [2] – S. I. F. S. Martins, M. A. J. S. Van Boekel, *A kinetic model for the glucose /glycine Maillard reaction pathways – Food Chem.* **90** (2005) 257-269.
- [3] – T. B. Adams, J. Doull, J. I. Goodman, I. C. Munro, P. Newberne, P. S. Portoghese, R. L. Smith, B. M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, R. A. Ford, *The FEMA GRAS assessment of furfural used as flavour ingredient – Food Chem. Toxicol.* **35** (1997) 739-751.
- [4] – C. Janzowzki, V. Glaab, E. Samimi, J. Schlatter, G. Eisenbrand, *5-hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potencial and reactivity towards cellular glutathione – Food and Chem. Toxicol.* **38** (2000) 801-809.
- [5] – J. S. Câmara, *Caracterização aromática de castas produtoras de vinho Madeira – Boal, Malvasia, Sercial e Verdelho*, Tese de Doutoramento, Universidade da Madeira, Funchal, 2004.

# ELABORAÇÃO DE DOCES DE CASTANHA

Santos, C.; Correia, P.\*

\*Escola Superior Agrária de Viseu. Quinta da Alagoa. Estrada de Nelas. 3500-606 VISEU.  
Tel +351232446600 Fax +351232426536 e-mail: [paulacorreia@esav.ipv.pt](mailto:paulacorreia@esav.ipv.pt)

**Palavras-Chave:** Castanha, doce, análise sensorial, composição

**Resumo:** Este trabalho teve como intuito a valorização da castanha, a qual se apresenta, no nosso país, como um importante recurso económico, nomeadamente aqueles que adquirem rendimentos da sua produção, comercialização e transformação. Neste sentido, foram realizados alguns ensaios com vista à optimização de três doces, tendo como base uma formulação e elaboração tradicional. Dos doces elaborados, dois foram realizados só com castanha, onde foram utilizados dois aromas, anis e baunilha, e outro com castanha e maçã. Foram utilizadas castanhas frescas (puré) e farinha de castanha que tinha sido previamente desidratada. Numa primeira fase os doces foram provados por um painel semi-treinado de 10 provadores, posteriormente, e após optimização foram avaliados por um grupo de 50 provadores não treinados nem seleccionados. Verificou-se que os doces que obtiveram melhor pontuação foram os doces elaborados com puré de castanha. Dos três doces elaborados o que obteve melhor pontuação foi o de puré de castanha e maçã e o de puré de castanha com baunilha.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção europeia de castanhas representa cerca de 16% da produção do mundo e a principal espécie é a *Castanea sativa* Mill. Portugal é o segundo produtor de castanha da Europa com 31051 Mt em 2005 [1]([www.fao.org](http://www.fao.org)).

A castanha é consumida maioritariamente em fresco, sendo uma pequena percentagem destinada para a indústria alimentar. O elevado consumo em fresco deve-se ao seu valor nutricional e características organolépticas, bem como ao aumento da procura por parte do consumidor de produtos biológicos [2]. No entanto poderá proceder-se à sua conservação, nomeadamente a secagem e a congelação. O uso da farinha da castanha como substituto dos cereais pode aumentar o valor nutritivo dos produtos transformados, por exemplo, o teor de lisina é maior na farinha de castanha do que na farinha dos cereais [3].

Actualmente com os métodos tradicionais e com novas metodologias de armazenamento e processamento, com um mercado de consumidores cada vez mais forte e exigente, onde se procura confeccionar a castanha durante o ano todo, precisando-se que esta esteja disponível no mercado leva a que haja necessidade de novos produtos. Assim, Com o objectivo de se utilizar a castanha no processamento de alimentos foi ainda estudado e optimizado a elaboração de doces, bolachas e biscoitos.

## 2. METODOLOGIA

Para a confecção dos doces foram usadas como ingrediente base os frutos frescos e farinhas resultantes dos mesmos. Os frutos frescos foram cozidos e transformados em puré. Para a obtenção das farinhas de castanha, as castanhas foram também secadas artificialmente a 42°C numa estufa eléctrica com circulação de ar modelo FD 115 BINDER, durante 24 horas. Após este período procedeu-se ao descasque e fraccionamento do fruto em pedaços pequenos, para facilitar a operação de moagem. Estes pedaços foram secos nas mesmas condições durante 48 horas. Após a secagem as castanhas foram moídas num moinho RETSCH SK 100 Comfort Gubeisen.

Foram definidas três formulações base, tendo por base as sugestões dadas por Jorge Lage [4], duas só utilizando castanha (uma com licor de anis e outra com aroma de baunilha) e uma com castanha e puré de maçã variedade *Golden delicious*.

Numa primeira fase os produtos foram analisados por um painel constituídos por 10 provadores seleccionado e semi-treinados. O tipo de prova utilizado foi a prova de preferência, tendo sido avaliados quanto ao aspecto, cheiro, sabor, aroma e preferência. A escala utilizada foi uma escala de intensidade (0-10). Após uma optimização das formulações iniciais, os doces foram avaliados sensorialmente por 50 provadores não treinados, tendo sido avaliados também o aspecto, cheiro, sabor, aroma, referindo a sua apreciação global.

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa Excel, Microsoft Windows®.

### 3. RESULTADOS

Relativamente aos estudos elaborados com vista à utilização da castanha na indústria alimentar, a elaboração dos doces foi realizada de acordo com o Quadro 1.

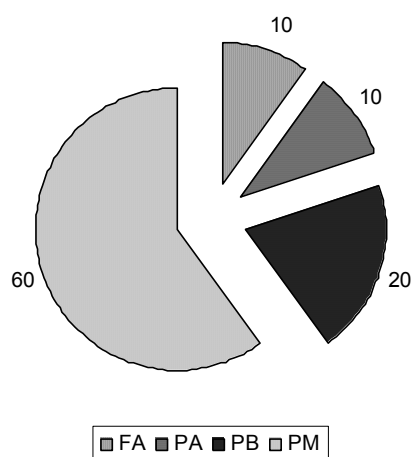
**Quadro 1** – Formulações dos doces de castanha

| Ingrediente    | Iniciais* |      |          |     |       |       | Optimizadas |      |          |     |       |       |
|----------------|-----------|------|----------|-----|-------|-------|-------------|------|----------|-----|-------|-------|
|                | Anis      |      | Baunilha |     | Maçã  |       | Anis        |      | Baunilha |     | Maçã  |       |
|                | F         | P    | F        | P   | F     | P     | F           | P    | F        | P   | F     | P     |
| Quantidade (g) | 200       | 200  | 200      | 200 | 80    | 80    | 200         | 200  | 200      | 200 | 40    | 40    |
| Açúcar (g)     | 100       | 100  | 200      | 200 | -     | -     | 100         | 100  | 100      | 100 | -     | -     |
| Água (ml)      | 10        | 10   | 10       | 10  | 10    | 10    | 50          | 50   | 50       | 50  | 40    | 40    |
| Aroma/maçã**   | 4 ml      | 4 ml | 1 g      | 1 g | 120 g | 120 g | 8 ml        | 8 ml | 3 g      | 3 g | 160 g | 160 g |

F- farinha; P- puré

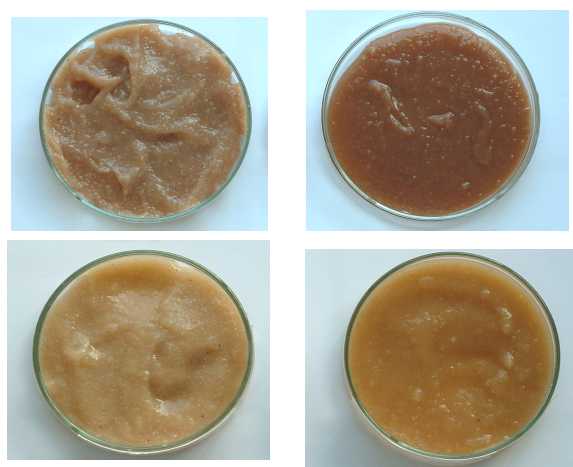
\* ml para o licor de anis e g para o aroma de baunilha e puré de maçã.

Da primeira análise, efectuada por 10 provadores semi-treinados, verificou-se que se tinha de melhorar os seguintes aspectos: cor, os doces com anis e maçã revelaram possuir pouca intensidade de aroma, a consistência dos doces era muito elevada, levando a uma má pontuação, principalmente no doce de baunilha, na característica sabor (entre 1,4 e 3,6). A Figura 1 mostra o resultado da apreciação global, comparando os seis doces 60 % dos provadores preferiram o doce de puré de castanha com maçã. È de realçar ainda que os doces que possuíam na composição puré de castanha foram os mais apreciados, em detrimento da farinha de castanha. Houve uma reformulação dos mesmos atendendo a estes resultados, reformulação essa que se encontra representada no Quadro 1.



**Figura 1** – Apreciação global dos doces iniciais (FA - doce de farinha de castanha com anis; PA - doce de puré de castanha com anis; PB - doce de puré de castanha com baunilha; PM - doce de puré de castanha com maçã). Os doces de farinha com baunilha e com maçã tiveram pontuação nula.

A Figura 2 mostra ao aspecto de alguns dos doces depois de otimizados. Nesta fase os doces foram apreciados por 50 provadores não treinados que gostaram mais dos doces com o puré de castanha quanto ao aspecto e à cor, no entanto em termos de consistência pontuaram melhor os doces elaborados com a farinha, com uma pontuação entre 7 e 7,5.



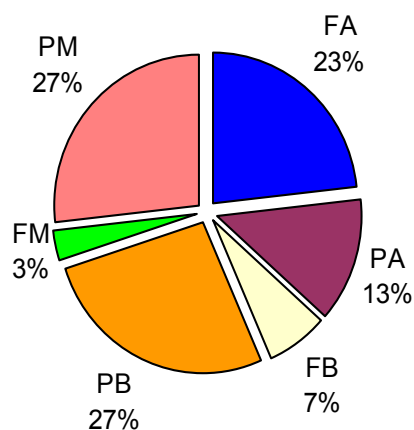
**Figura 2** – Doces de farinha (F) de castanha com aroma de baunilha (B) e com pura de maçã(M)

Os doces mais apreciados os de puré de castanha com maçã e o puré de castanha com baunilha (Figura 3).

#### 4. CONCLUSÃO

Deste estudo pode-se concluir que o modo como se apresenta a castanha, cozida (puré) ou em farinha vai influenciar a apreciação dos doces confeccionados quer com aromas (a anis ou a baunilha) que com maçã. Embora o doce de castanha com o aroma a baunilha é preferido ao doce de castanha com licor de anis, esta diferença não é significativa, correspondendo apenas à opinião de dois provadores.

Os resultados deste trabalho podem revelar que mais estudos se deverão realizar para existir uma valorização deste produto que constitui uma importante fonte de rendimento para as populações rurais das regiões do Norte e Centro do país.



**Figura 3** – Apreciação global dos seis doces otimizados (FA- doce de farinha de castanha com anis; PA – doce de puré de castanha com anis; FB – doce de farinha de castanha com aroma de baunilha; PB – Doce de farinha de castanha com aroma de baunilha; FM – doce de farinha de castanha com puré de maçã; PM – doce de purá de castanha com puré de maçã).

#### Agradecimentos

Ao projecto AGRO 448“Valorização e preservação da biodiversidade de variedades de castanha na Região Centro e Norte de Portugal”, no âmbito do Programa PRODEP III, ao Sr. Eng.º Augusto Assunção, da Direcção Regional de Agricultura do Minho, ao Sr. Eng.º Francisco Matos Soares e ao Sr. Eng.º José Sequeira, da Direcção Regional de Agricultura da Beira, e Sr.ª Eng.ª Leontina Fonseca e Sr. Eng.ª M.ª Helena Bandeira e Sr. Manuel Salazar da Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, pela recolha e cedência de material para estes estudos.

#### Referências

- [1] [www.fao.org](http://www.fao.org)
- [2] E. Bellini. *The chestnut tree and its resources: images and considerations*. Abstracts Proceeding Book. III<sup>th</sup> International Chestnut Congress. Chaves. Portugal (2004)
- [3] G. Sacchetti, G. G. Pinnavaia, E. Guidolin, M. D. Rosa. *Food Research International* 37(2004), 527-534.
- [4] J. Lage. *A Castanha - Saberes e Sabores*. Câmara Municipal de Valpaços. Valpaços (2003)

## **ESTUDO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DA REGIÃO DO SOTAVENTO ALGARVIO**

*Cavaco, T<sup>1</sup>.; Ktenidou, C<sup>2</sup>.; Figueira, A.C.O.L.<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Alimentar, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Algarve, *Campus da Penha, 8005-139 Faro, Portugal. \*afiguei@ualg.pt*

<sup>2</sup>Department of Food Technology, Technological Educational Institution of Thessaloniki, 54101 Thessaloniki, P.O. Box 14561, Greece.

Trinta amostras de mel foram recolhidas na Região do Sotavento Algarvio durante o ano de 2006. A potencial actividade antioxidante destas amostras foi investigada, através da determinação de parâmetros relevantes, nomeadamente o teor em compostos fenólicos, flavonóides, em radicais livres e em capacidade antioxidante.

Foi realizada uma análise de correlação entre os valores dos diferentes parâmetros obtidos. Efectuou-se ainda uma análise de correlação entre estes parâmetros e, nomeadamente, a sua origem floral e teor em prolina.





# ESTUDO DA QUALIDADE SENSORIAL DO LOMBO DE NOVILHOS DA RAÇA ALENTEJANA

<sup>\*1</sup>Canada, J.; <sup>1</sup>Ferro Palma, S., <sup>1</sup>Barata de Carvalho, M.J. e <sup>2</sup>Santos Oliveira, J.

1 - ADCTA, Escola Superior Agrária de Beja, Rua Pedro Soares, 7801-902 Beja, Portugal,

Tel: 00351284314300, Fax: 00351384388207; email: joao.canada@esab.ipbeja.pt;

2 - GDEH – FCT – Universidade Nova de Lisboa, Quinta

**Palavras – Chave:** Análise sensorial, análise de perfil de textura, maturação

## 1. RESUMO

As raças denominadas locais ou autóctones, assumem particular relevo pelo contributo que dão para a manutenção do espaço rural através da fixação de populações e da protecção do ambiente [1]. Os bovinos autóctones da raça Alentejana são criados em sistema extensivo, alimentando-se de pastagens naturais, à base de bolota, feno, restolho e palhas, em sinergia perfeita com o cultivo tradicional de cereais. Este tipo de criação confere à carne características organolépticas consideradas especiais [2].

Neste trabalho é feita uma abordagem de parâmetros físico-químicos (pH, cor, humidade, actividade da água, capacidade de retenção da água e gordura), reológicos (dureza, adesividade, coesividade, mastigabilidade, elasticidade, gomosidade e resistência ao corte) e sensoriais (tenrura, suculência, flavour, persistência e apreciação global), com o objectivo de contribuir para uma melhor avaliação da qualidade da carne de novilhos da raça Alentejana.

Os parâmetros sensoriais analisados não apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 5$ ) nas amostras de *Longissimus dorsi* tratadas em forno microondas e em forno convector. Os parâmetros físico-químicos pH, humidade e gordura apresentaram correlações significativas para a avaliação da qualidade sensorial da carne. Os parâmetros reológicos dureza, adesividade, coesividade e elasticidade contribuíram para uma melhor análise da qualidade da textura da carne, dado que estão significativamente correlacionadas com os parâmetros sensoriais, o que contribuiu para uma melhor avaliação da qualidade do lombo de novilho de raça Alentejana.

## 2. INTRODUÇÃO

Na Península Ibérica, a carne de bovino de raças autóctones tem uma posição privilegiada no consumo, o que tem dado origem à elaboração de diversos trabalhos de investigação sobre a sua qualidade [3], [4], [5] e [6].

O estudo do perfil sensorial da carne de novilhos da raça Alentejana constituiu o objectivo principal deste trabalho, equacionando a importância dos parâmetros físico-químicos e reológicos no respectivo perfil sensorial. No âmbito da caracterização físico-química é feita uma abordagem aos seguintes parâmetros: pH, humidade, capacidade de retenção de água (CRA), actividade da água ( $a_w$ ) e teor em gordura total. A avaliação dos parâmetros reológicos, foi concretizada determinando a dureza, a adesividade, a coesividade, a mastigabilidade, a elasticidade, a gomosidade e a resistência ao corte. Os atributos sensoriais foram analisados por um painel de provadores com treino específico.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico utilizado é constituído por amostras do músculo *Longissimus dorsi* de novilhos certificados da raça Alentejana. Designaram-se por carne verde as amostras analisadas no matadouro, após 48 h de abate, por carne maturada as amostras analisadas após a maturação e por carne cozinhada as amostras sujeitas a tratamento térmico. As análises físico-químicas à carne verde foram o pH a 20°C e a cor da CIE (Lab). As análises físico-químicas à carne maturada foram pH a 20°C, cor da CIE (Lab), humidade, actividade da água

( $a_w$ ), capacidade de retenção da água (CRA), pigmentos hemínicos e gordura total. As análises físico-químicas à carne cozinhada foram humidade e gordura total.

Efectuaram-se análises reológicas à carne maturada e à carne cozinhada de perfil de textura (TPA – “*texture profile analysis*”) e o teste de penetração simples, com uma sonda *HDP/BSG Blade Set With Knife*. As análises sensoriais à carne cozinhada avaliaram a tenrura, suculência, flavour, persistência, gosto residual e apreciação global.

Para avaliar a capacidade de discriminação de um determinado parâmetro, entre os diferentes tratamentos térmicos a que a carne foi sujeita para análise do perfil sensorial, foi efectuado o teste de comparação de médias “ANOVA post hoc comparisons Scheffé contrasts” ( $p \leq 0,05$  e  $N=10$ ) [7].

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As carnes analisadas apresentaram valores de pH normais (Figura 1), oscilando em torno de 5,6 – 5,8 [8], não havendo diferenças significativas entre os valores das amostras de carne verde e carne maturada.

Na carne maturada (CaM) foram analisadas as diferentes fracções de água presente nos lombos ( $n=10$ ), apresentando diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) os valores de humidade total da carne maturada (CaM), para as carnes tratadas termicamente (CaTTF e CaTTM) (Figura 2).

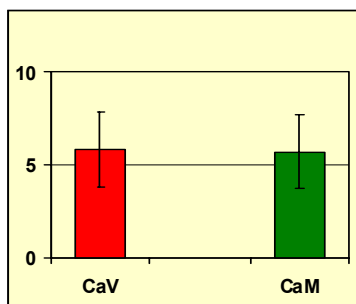


Figura 1 – pH na carne verde (CaV) e na carne maturada (CaM)

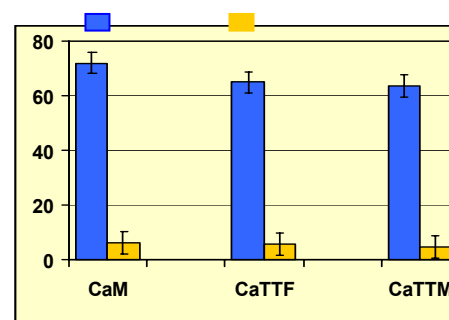


Figura 2 – Humidade e gordura na carne maturada (CaM) e nas carnes cozinhadas (CaTTF e CaTTM)

Os parâmetros reológicos do perfil de textura, da carne maturada (CaM) e das carnes sujeitas a diferentes tratamentos térmicos apresentaram diferenças significativas na mastigabilidade e na coesividade ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 3). No ensaio de penetração simples, verificou-se que entre a carne maturada (CaM) e as carnes sujeitas a diferentes tratamentos térmicos os resultados apresentaram diferença significativa na resistência ao corte e no trabalho da força de corte (figura 4).

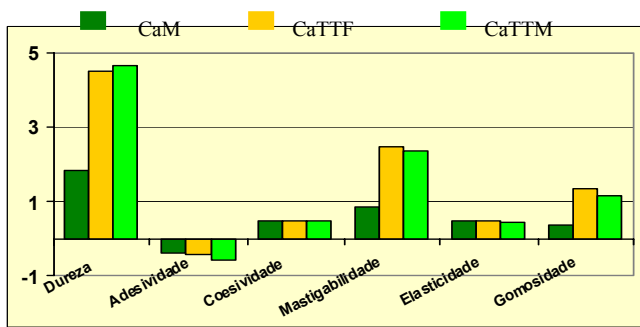


Figura 3 - Análise de Perfil de Textura em trabalho da força de corte em carne (CaTTF e CaTTM).

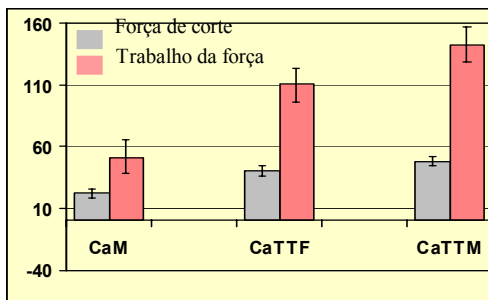


Figura 4 - Resistência ao corte e carne maturada (CaM) e carnes cozinhadas maturada (CaM) e em carnes cozinhadas (CaTTF e CaTTM)

Em relação aos parâmetros sensoriais tenrura, suculência e flavour, verificou-se que em todos os atributos as amostras de carne tratadas em forno convector (CaTTF) apresentaram valores médios ligeiramente superiores aos registados nas amostras tratadas em forno microondas (CaTTM), apesar de não se verificarem diferenças significativas entre os diferentes tratamentos térmicos (figura 5).

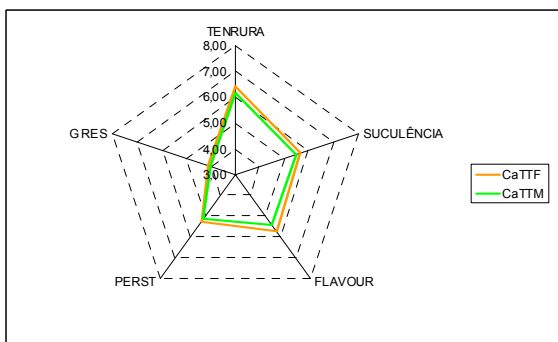


Figura 5 - Tenrura, suculência, flavour, persistência e gosto residual nas carne cozinhadas (CaTTF e CaTTM).

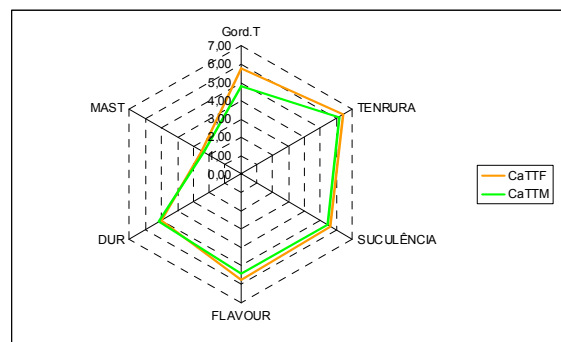


Figura 6 - Tenrura, suculência, flavour, gordura, dureza e mastigabilidade nas carnes cozinhadas

A tenrura e a suculência estão intimamente relacionadas, e durante a mastigação, a detecção de líquido libertado acompanha a fragmentação da carne e reduz a sensação de dureza, sendo que as principais fontes de suculência da carne são o seu conteúdo aquoso e os lípidos intramusculares [9]. Os lípidos são precursores do aroma da carne, prevalecendo um consenso

em que muitos dos compostos voláteis da carne cozida são predominantemente compostos derivados dos lípidos. O tipo e a intensidade do flavour produzido também é influenciado pela quantidade de gordura presente na carne, facto que pode ser evidenciado na figura 6, em que se constata que, um maior conteúdo de gordura dá origem a valores mais elevados de flavour.

## 5. CONCLUSÕES

Os parâmetros sensoriais analisados (tenrura, suculência, flavour, persistência, gosto residual) e a apreciação global não apresentaram diferenças significativas nas carnes tratadas em forno microondas e em forno convector.

Os parâmetros físico-químicos pH, humidade e gordura apresentaram correlações significativas para a avaliação da qualidade sensorial da carne.

Os parâmetros reológicos dureza, adesividade, coesividade e elasticidade contribuíram para uma melhor análise da qualidade da textura da carne, e apresentam correlações significativas com os parâmetros sensoriais (tenrura, suculência, flavour, persistência, e apreciação global), o que contribuiu para uma melhor avaliação da qualidade do lombo de novilho da raça Alentejana.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Sousa, F. (1994). *Sistemas agrários e melhoramento dos bovinos de raça mirandesa. O caso da freguesia de Paço*. Série Estudos ESAB. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.
- [2] [http://www.idrha.minagricultura.pt/produtos\\_tradicionais/bovinos/index.htm](http://www.idrha.minagricultura.pt/produtos_tradicionais/bovinos/index.htm)
- [3] Oliveira, D.L.M. (2003). *Avaliação da fracção lipídica intramuscular da carne de bovino da raça Mertolenga*. Relatório de projecto de curso de Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Beja. Beja.
- [4] Ruiz de Huidobro, F., Miguel, E., Ómega, E. e Blázquez, B. (2003). “Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem”. *Meat Science*, **65**: 1439-1446.
- [5] Silva, J.A., Patarata, L. e Martins, C. (2000). “Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing.” *Meat science*, **52**: 453-459.
- [6] Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E. e Ouali, A. (1996). “Predicting variability of ageing and toughness in beef *M. longissimus lumborum et thoracis*.” *Meat Science*, **43**: 321-333.
- [7] Alvarenga, N.B.M.G. (2000). *Estudos em textura de queijo Serpa*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- [8] Farraia da Graça, J. C. (1987). *Ciência da Carne – Conceitos actuais sobre limpeza e refrigeração de carcaças*. Publicações Ciência e Vida. Nº 6.
- [9] Ordóñez, J.A.P., Cambero Rodríguez, M.I., Fernández Álvarez, L., Garcia Sanz, M.L., Garcia de Fernando Minguillón, G., Lorenzo de la Hoz Perales, Selgas Cortecero, M.D. (1998). *Tecnología de los Alimentos – Alimentos de origen animal*. Vol. II. Facultad de Veterinaria da Universidad Complutense de Madrid. Editorial Sintesis. Madrid.

# IMPORTÂNCIA DO PERFIL DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GORDOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BOLOTA E DA ERVA DA PASTAGEM EXPONTÂNEA DO MONTADO NO MANEIO ALIMENTAR DO PORCO ALENTEJANO (*Sus ibericus*)

Oliveira, A.R.

Escola Superior Agrária Instituto Politécnico Beja R. Pedro Soares, Aptd.º 6158, 7801-908 Beja  
Tel+284 314 300 Fax +351 284 388 207 - e-mail: [aro@esab.ipbeja.pt](mailto:aro@esab.ipbeja.pt)

## RESUMO

Neste trabalho salientamos a importância do manejo alimentar do Porco Alentejano na fase de engorda em montanha, recorrendo ao tritcale em grão, como complemento da ração, quando há escassez/penúria de recursos alimentares locais devido à degradação do ecossistema montado.

Assim, analisamos por Cromatografia Gasosa o perfil da composição química dos principais ácidos gordos de amostras de bolota sem casca e de erva da pastagem espontânea e comparamos os resultados de três explorações no Baixo Alentejo em 1999-2000 e 2005-2006, respectivamente, durante o período de montanha.

Na bolota, verificamos diferenças significativas a nível dos ácidos gordos palmítico ( $P \leq 0,001$ ), oleico ( $P \leq 0,01$ ) e linoleico ( $P \leq 0,01$ ), dos  $\Sigma$  dos ácidos gordos ímpares ( $P \leq 0,001$ ), dos saturados ( $P \leq 0,05$ ) e dos poliinsaturados ( $P \leq 0,05$ ), enquanto que no ácido esteárico, nos  $\Sigma$  dos insaturados e dos monoinsaturados, não observamos diferenças significativas.

Na erva, observamos diferenças significativas, apenas nos  $\Sigma$  ácidos gordos ímpares ( $P \leq 0,001$ ) e insaturados ( $P \leq 0,01$ ), enquanto que nos restantes ácidos gordos saturados e nos  $\Sigma$  dos saturados, dos monoinsaturados e dos poliinsaturados, não encontramos diferenças significativas.

Salientamos que os 4 tipos de ácidos gordos saturados, em percentagens padronizadas, recomendados pela *Norma de Calidad* (RD 1083/2001), integram os parâmetros definidores da qualidade de produtos finais do porco Ibérico e Alentejano (carne fresca, presuntos e enchidos).

Futuramente, os parâmetros físico-químicos e sensoriais, aliados ao genótipo e vigilância do manejo alimentar do rebanho, particularmente na fase de montanha, serão factores determinantes da qualidade de produtos finais do Porco Alentejano, face à segurança, qualidade alimentar e rastreabilidade visando a denominação de origem dos mesmos.

Assim, alertamos as entidades envolvidas na fileira da raça em estudo, que a manutenção da qualidade dos saturados produtos depende da administração até 3 Kg de tritcale, como complemento da ração diária/animal, no manejo alimentar da vara, quando há escassez/penúria alimentar no terço final da engorda em montanha.

Palavras Chave: Porco Alentejano, Maneio Alimentar, Montanha, Cromatografia Gasosa, Perfil Ácidos Gordos, Bolota, Erva da Pastagem, Tritcale.

## 1 - INTRODUÇÃO

O porco Alentejano é a principal raça suína autóctone Portuguesa, em termos de efectivo pecuário autóctone. Em 2005 cerca de 9000 reprodutoras inscritas no LGPS e cerca de 55000 leitões registados anualmente no Livro de Nascimento [1]. Os produtos finais provenientes desta raça suína manifestam características *sui generis*, quando a vara é engordada em pastoreio na montanha, durante um período mínimo de dois meses e meio (Outubro a Fevereiro), alimentando-se de recursos alimentares locais (essencialmente à base de bolota, de erva da pastagem espontânea, etc.).

A alimentação atrás referida, confere geralmente aos produtos finais do porco Alentejano, valor acrescentado reconhecido pelos Organismos de Certificação de Denominações de Origem (DO).

Quanto ao perfil e percentagem dos 4 ácidos gordos maioritários constituintes da composição química dos produtos finais do porco Alentejano, os valores recomendados aos Produtores pela Associação [2] para a campanha de montanha 2005-06, foram os seguintes: (Palmítico  $\leq 21,6$  %, Esteárico  $\leq 10,3$  %, Oleico  $\geq 53,3$  % e Linoleico  $\leq 10,2$ ), conforme a *Norma de Calidad* para o Porco Ibérico (*RD 1083/2001*), permitindo deste modo a exportação para Espanha entre 20 a 22 % do total da produção anual de porcos Alentejanos engordados em montanha [1].

Os resultados de vários estudos científicos sobre o porco Alentejano são demonstrativos da elevada qualidade dos seus produtos finais, quando a vara é alimentada em pastoreio no montado [3, 4, 5, 6, 7, 8], cuja área actual é de 1 milhão e 200 mil ha e só 13,3% da referida área é utilizada para suinicultura extensiva.

Como é do conhecimento a degradação do ecossistema montado é um facto, ora agravado pelo efeito das secas [34], que são cíclicas no Alentejo [9, 10], não descurando as alterações climáticas e a poluição atmosférica por Gases com Efeito de Estufa, [11], que provocam os seus efeitos sobre recursos naturais e florestais, que por sua vez influenciam a produção de recursos alimentares locais.

Para minorar o efeito da penúria alimentar, quando há seca ou outros factores que degradam o ecossistema montado, o produtor pode administrar no terço final da engorda do seu rebanho ou ração indicada pela Associação ou recorre ao cereal tritcale em grão, visto que altera muito pouco o perfil metabólico e a composição química dos principais ácidos gordos insaturados, tal como já foi demonstrado por [7] e pelos Autores do Projecto Agro n.º 321 [12].

Recentemente, os resultados apresentados por [13, 14], em relação ao porco Ibérico, quanto ao maneio alimentar, durante a fase de acabamento são extraordinários, porque os 4 ácidos indicados pela *Norma (RD 1083/2001)*, são fáceis de calibrar utilizando rações comerciais, como está demonstrado por [14], o que causa perplexidade e preocupação, quanto à qualidade e genuinidade dos produtos, nos produtores e na fileira do porco Alentejano.

Assim, face à “Bolotização” de rações comerciais, defendemos a sustentabilidade do ecossistema montado com todas as suas valências e potencialidades no âmbito da Nova Ordem Zootécnica visando a optimização dos seus recursos alimentares locais, tal como defenderam [15]. Assim sendo, recomendamos a criação dum Organismo Oficial Independente de Controlo das actividades da Fileira do Porco Alentejano para preservar a genuinidade e a qualidade dos produtos finais e os alimentos do ecossistema montado e que promova a sustentabilidade dos sistemas de exploração e o bem-estar animal da raça suína autóctone em estudo, pelo que seria desejável implementar a monitorização das herdades/explorações existentes, bem como a identificação electrónica animal dos efectivos. Também, recomendamos uma melhor utilização das várias metodologias e técnicas de caracterização de produtos finais do porco Alentejano [3 a 8 e 16 a 18] e já aplicadas com êxito no porco Ibérico [19 a 33], embora algumas são bastante onerosas, permitem destriçar com rigor, regimes alimentares e produtos finais, que não são provenientes das respectivas raças.

Assim, decidimos apresentar mais esta nótula científica preliminar, comparando o maneio alimentar (ensaio de 1999-00 com o de 2005-06) com o seguinte objectivo: analisar a composição química percentual da bolota sem casca, da erva da pastagem espontânea e comparar o perfil dos principais ácidos gordos, salientando a importância da eficácia do maneio alimentar durante a fase de pastoreio em montanha do porco Alentejano e a sua influência na qualidade dos produtos finais.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

Para a realização deste trabalho, procedemos à recolha de amostras de bolota e de erva da pastagem em três explorações no Baixo Alentejo (Santa Luzia, Junqueira e Rascas), pertencentes às três varas seleccionadas durante o ensaio de 1999-00, que foi replicado em 2005-06. Ambos os ensaios foram efectuados durante a fase de pastoreio em montanha de cada um dos rebanhos.

De referir que a seca que assolou o País no ano agrícola 2004-05, conforme o Relatório do Instituto Meteorológico [34], com particular incidência na região do Alentejo (seca na sua maioria severa), provoca naturalmente desequilíbrios no ecossistema montado.

### **2.1 – Recolha de Amostras**

Foram recolhidas amostras da bolota e da erva da pastagem espontânea. Assim sendo, recolhemos 500g/amostra e um total de três amostras durante cada ensaio experimental, no início, a meio e no fim da montanha, as quais foram enviadas para análise no Laboratório Pró-Qualidade.

A erva da pastagem espontânea das explorações onde decorreram os ensaios experimentais na montanha suplementada (1999-00 e 2005-06), são constituídas essencialmente por uma consociação de gramíneas e leguminosas espontâneas, que são os principais elementos da composição florística do Alentejo [35].

Para a recolha das amostras da erva da pastagem supracitada em cada uma das explorações em estudo, traçamos um triângulo imaginário de aproximadamente 100 m de lado e em cada um dos vértices do referido triângulo, procedemos à recolha de aproximadamente 500 g. Cada amostra de erva da pastagem foi congelada a (-18 °C) e enviada de imediato ao supracitado laboratório para análise.

Em todas as amostras estudamos o mesmo conjunto de parâmetros, no qual salientamos apenas o perfil dos principais ácidos gordos determinados por Cromatografia Gasosa (Reg. CEE n.º 2568/91), cuja metodologia encontra-se descrita em [7].

Dentro do perfil dos ácidos gordos analisados referimos apenas os quatro ácidos gordos maioritários C16:0 (Palmítico), C18:0 (Estearico), C18:1 (Oleico-w9), C18:2 (Linoleico-w6) e os somatórios ( $\Sigma$ ), respectivamente, dos ímpares, dos saturados, dos insaturados, dos monoinsaturados e dos poliinsaturados, tendo em conta os tipos de alimento (Bolota sem Casca e Erva da Pastagem).

De referir que os 4 tipos de ácidos supracitados integram os principais parâmetros definidores da qualidade dos produtos finais para o porco Ibérico recomendados pela ACPA/UNIAPRA (2005-06), para os do porco Alentejano, conforme a *Norma de Calidad*.

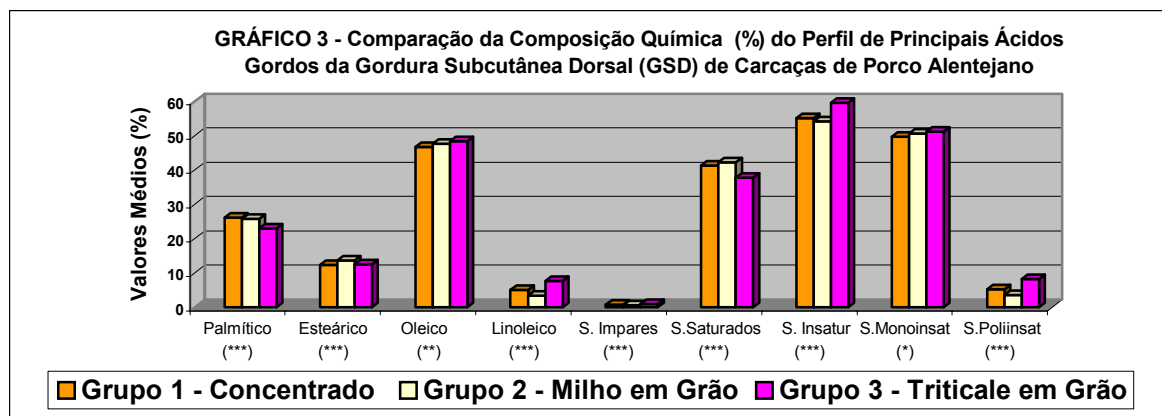
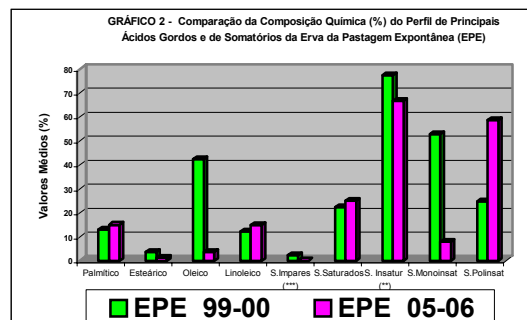
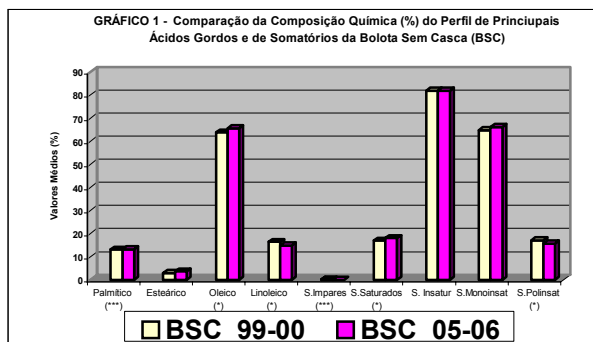
### **2.2 – Análise Estatística**

Todas as variáveis estudadas, foram sujeitas a análise estatística, recorrendo para tal ao programa informático *Office Microsoft Excel 1985-1999* (2000), tanto para a estatística descritiva simples como para a análise de variância (ANOVA) .

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises dos ensaios de 1999-00 e 2005-06 e a comparação da composição química percentual da bolota sem casca e da erva da pastagem espontânea, encontram-se apresentados nos Gráficos 1 e 2, respectivamente.

Pela análise dos resultados obtidos da bolota (Gráfico 1) e da erva (Gráfico 2), verificamos que houve alterações significativas ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$ ), tal como seria de esperar, na composição química das matérias primas da alimentação estudada [3, 7, 18].



O tipo de alimentação influencia a composição química percentual dos produtos finais do porco e como é obvio os dos rebanhos de porcos da campanha de montanha 2005-06, cujos resultados aguardamos, não descurando o efeito provável da seca ocorrida em 2004-05.

No Gráfico 3, observamos na Gordura Subcutânea Dorsal (GSD) o efeito da alimentação do triticale em grão administrado no terço final da engorda de uma vara de porcos Alentejanos em comparação com o do milho em grão e da ração comercial. [7]. O fenómeno da insaturação é maior, quando usamos o triticale em grão como complemento alimentar

### 5 – CONCLUSÕES

Comparando os resultados do perfil da composição química percentual dos principais ácidos gordos constituintes dos recursos alimentares locais do montado (1999-00 com 2005-06), concluímos que: **a)** Na bolota sem casca, observamos aumentos significativos, nas % dos ácidos palmítico (C16:0) ( $p \leq 0,001$ ) e oleico-w9 (C18:0) ( $p \leq 0,05$ ) e dos  $\Sigma$  dos saturados ( $p \leq 0,05$ ) e uma diminuição significativa nas % do ácido linoleico-w6 (C18:2) ( $p \leq 0,05$ ) e nos  $\Sigma$  dos impares ( $p \leq 0,001$ ) e  $\Sigma$  dos poliinsaturados ( $p \leq 0,05$ ); **b)** Na erva da pastagem espontânea, verificamos uma diminuição significativa nas % dos  $\Sigma$  dos ácidos gordos impares ( $p \leq 0,001$ ) e dos  $\Sigma$  dos insaturados ( $p \leq 0,01$ ), respectivamente.

### 6 – BIBLIOGRAFIA

O Autor enviará aos interessados a Bibliografia através de solicitação pelo e-mail: [aro@esab.ipbeja.pt](mailto:aro@esab.ipbeja.pt)



# INOVAÇÃO EM ALIMENTOS TRADICIONAIS: A SALSICHA QUE VEIO DO MAR

Cardoso, C.\*; Mendes, R., Pedro, S. e Nunes, M.L.

Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, INIAP/IPIMAR, Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca  
Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa  
Tel +351 21 302 7036 Fax: +351 21 301 5948 e-mail: ccardoso@ipimar.pt

**Palavras-chave:** salsicha de peixe, fibra dietética, textura, análise sensorial, microbiologia

**Resumo:** A necessidade de aproveitar recursos subvalorizados e de encontrar novos mercados no domínio dos produtos da pesca levou ao desenvolvimento de um conceito inovador, uma salsicha Frankfurter de pescada, hipocalórica e contendo fibra dietética. O processo de desenvolvimento envolveu dois passos: substituição integral da carne de porco por pescada e substituição completa do toucinho por uma fibra de chicória (Fibruline). A sensação oleosa proporcionada pela Fibruline evitou possíveis prejuízos sensoriais decorrentes da remoção do toucinho. Adicionalmente, a ingestão de fibra dietética é benéfica para a saúde, pois reduz o risco de cancro do cólon. Assim, criou-se uma salsicha saudável de peixe que mimetiza as propriedades sensoriais (odor, sabor e textura) de uma típica salsicha Frankfurter de porco. Posteriormente, estudou-se a estabilidade das salsichas embaladas sob vácuo e armazenadas em refrigeração (2 °C) através de análises texturais, sensoriais e microbiológicas, tendo sido encontrado um tempo de conservação útil de cerca de um mês.

## 1. INTRODUÇÃO

Existe uma procura crescente de produtos vegetarianos e de produtos cárnicos com baixo teor de gordura. Deste modo, tem aumentado o interesse pelos análogos cárnicos e pelos substitutos de gordura, através do uso de fontes alternativas de proteína [1]. Neste contexto, produtos reestruturados de peixe e novos ingredientes alimentares têm sido usados para chegar a consumidores preocupados com questões de saúde, mas também para valorizar espécies sub-aproveitadas e restos industriais de pescado [2]. Entre os produtos cárnicos tradicionais, a salsicha, pelas suas características organolépticas e tecnológicas, é adequada para a experimentação da substituição de carne por peixe. Diferentes salsichas de peixe têm sido desenvolvidas, contudo, em geral, não substituem totalmente a carne de porco [3] nem mimetizam a salsicha Frankfurter [4].

A fibra dietética (FD) é um dos ingredientes frequentemente usados na concepção de alimentos funcionais, em virtude do seu valor nutricional e benefícios para a saúde [5]. Para o presente estudo, foram seleccionadas duas fibras pelos seus efeitos favoráveis na textura (dados não publicados): a fibra interna de ervilha e a inulina de chicória. A incorporação de fibra de ervilha pode melhorar a dureza e a capacidade de retenção da água, enquanto a inulina pode funcionar como uma substituta da gordura, assegurando a cremosidade.

Por outro lado, o desenvolvimento de novos produtos alimentares requer um estudo de estabilidade, abrangendo a segurança microbiológica durante a armazenagem e a avaliação do tempo de conservação útil. De modo a garantir um longo período de estabilidade, o crescimento microbiano tem que ser inibido ou reduzido. Donde, várias barreiras ao crescimento bacteriano têm que ser consideradas. A embalagem sob vácuo é uma delas, pois evita o desenvolvimento de bactérias aeróbias. Porém, existem algumas bactérias patogénicas anaeróbias (*Clostridium botulinum*) ou anaeróbias facultativas (*Listeria monocytogenes*) que se multiplicam no peixe [6]. Relativamente à *L. monocytogenes*, um tratamento térmico moderado, 0,3-2 min a 70 °C, é eficaz na sua eliminação [6]. Contudo, o *C. botulinum* pode sobreviver a esta pasteurização, pelo que é aconselhável um tratamento térmico mais intenso,

10 min a 90 °C [7], reduzindo o número de esporos viáveis por um factor de  $10^6$ . Mesmo assim, para inibir o crescimento do tipo E não-proteolítico do *C. botulinum* (um patógeno importante no peixe), medidas adicionais podem ser necessárias, defendendo-se a conjugação de refrigeração (< 5 °C) e um teor apreciável de sal na fase aquosa ( $\geq 3\%$ ) [6]. Em suma, para um produto inovador como a salsicha de peixe, a aplicação simultânea de embalagem sob vácuo, tratamento térmico (10 min a 90 °C), refrigeração e adição de sal pode garantir a segurança microbiológica [6].

Assim, o objectivo deste trabalho foi duplo: desenvolver uma salsicha de peixe Frankfurter com um baixo teor em gordura e avaliar a estabilidade destes produtos (com toucinho ou com Fibruline e uma quantidade adicional de polpa de peixe) embalados sob vácuo e refrigerados a 2 °C durante um período de armazenagem de 80 dias.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria-prima e aditivos**

Pescada congelada da África do Sul (*Merluccius capensis*) descabeçada e eviscerada, obtida de uma empresa local de processamento de pescado. A carne de porco e o toucinho foram comprados num supermercado. As duas FD utilizadas, a fibra interna de ervilha (Swelite®) e a inulina de chicória (Fibruline Instant) foram fornecidas pela Cosucra, S.A. (Warcoing, Bélgica). Os outros aditivos eram ingredientes alimentares comuns.

### **2.2. Planeamento experimental**

O trabalho teve duas partes principais: o desenvolvimento de salsichas de peixe e o estudo da sua estabilidade durante armazenagem. Na primeira parte, procedeu-se à substituição da carne de porco por pescada (0, 50 e 100 %) e do toucinho pela combinação Fibruline: pescada adicional (2,6:5,2; 5,2:2,6 e 7,8:0,0 %, w/w), avaliando-se o efeito através de medições texturais. Na segunda, avaliou-se a estabilidade em refrigeração de dois produtos com ou sem toucinho (7,8 % toucinho vs 5,2 % Fibruline:2,6 % pescada adicional) ao longo de 80 dias, recorrendo a parâmetros texturais, sensoriais e microbiológicos.

### **2.3. Produção das salsichas**

As salsichas foram produzidas utilizando a metodologia e as quantidades referidas num trabalho prévio dos autores [8]. Em todas foi utilizado o mesmo nível de Swelite, 4 % (w/w).

### **2.4. Textura**

As salsichas foram cortadas em cilindros (25 mm de diâmetro e de altura) e estes sujeitos a testes de penetração e compressão, seguindo uma metodologia previamente descrita [8]. Várias propriedades foram determinadas: força de gel, elasticidade, dureza e coesividade.

### **2.5. Análise sensorial**

A avaliação sensorial foi efectuada por cinco provadores experientes do INIAP/IPIMAR. As salsichas foram servidas aleatoriamente aos provadores. Foi utilizada uma escala de 0-5: cor (0 – clara a 5 – escura), aroma a fumo (0 – ausente a 5 – excessivo), elasticidade (0 – plástica a 5 - elástica), dureza (0 – tenra a 5 - dura), gordura (0 – pouco oleosa a 5 – muito oleosa), sabor a peixe, a fumo e salgado (0 – ausente a 5 - excessivo).

### **2.6. Análise microbiológica**

A análise microbiológica envolveu várias contagens [8]: bactérias totais aeróbias (mesófilas e psicrófilas), enterobactérias, bactérias lácticas e esporos de clostrídios sulfito-redutores.

### **2.7. Análise estatística**

Uma análise factorial de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados. O teste de Tukey permitiu determinar as diferenças, consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito da substituição da carne de porco

O aumento de incorporação de pescada levou à redução da dureza e da força de gel ( $p \leq 0,05$ ), porém esta não foi alterada com o aumento do grau de substituição de 50 % para 100 % (Figura 1). A elasticidade e a coesividade não sofreram alterações (Figura 2). Tendo em conta que a diminuição da força de gel decorreu de uma menor resistência aquando da penetração, conclui-se que o principal efeito da substituição foi a produção de uma salsicha mais tenra. Um resultado semelhante foi obtido por outros autores [9]. Duas causas podem ser apontadas: o baixo teor total de colagénio [10] e a elevada humidade do peixe quando comparado com a carne de animais terrestres.

#### 3.2. Efeito da substituição do toucinho

Níveis crescentes de Fibruline reduziram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a coesividade, ao passo que a força de gel da salsicha mais rica em Fibruline (7,8 %) foi superior ( $p \leq 0,05$ ) à das outras salsichas (Figura 3). Adicionalmente, esta salsicha apresentou uma elasticidade inferior ( $p \leq 0,05$ ) à de toucinho (Figura 4). Por outro lado, a salsicha com baixo teor em Fibruline foi mais tenra ( $p \leq 0,05$ ) do que a de toucinho (Figura 4). Estes resultados mostraram que a substituição da gordura por elevados níveis de Fibruline, apesar dos ganhos em dureza, produziu uma salsicha de pior qualidade textural. Inversamente, a salsicha menos rica em Fibruline, embora não tão dura, revelou um perfil textural semelhante ao da salsicha com toucinho. Portanto, a incorporação de mais pescada parece ser a melhor solução de substituição do toucinho. Contudo, a Fibruline é essencial uma vez que esta FD mimetiza a sensação cremosa característica da gordura. Assim, optou-se por um compromisso (5,2 % Fibruline:2,6 % pescada adicional) capaz de garantir cremosidade sem um prejuízo considerável na textura.

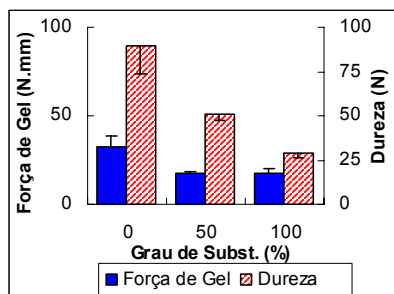


Figura 1 – Efeito da substituição da carne de porco na força de gel e na dureza

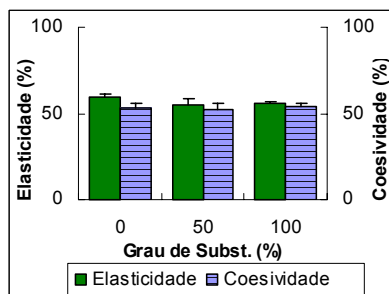


Figura 2 – Efeito da substituição da carne de porco na elasticidade e na coesividade

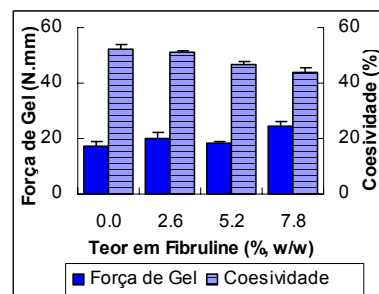


Figura 3 – Efeito do teor em Fibruline na força de gel e na coesividade

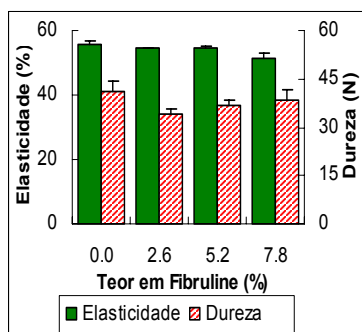


Figura 4 – Efeito do teor em Fibruline na elasticidade e na dureza

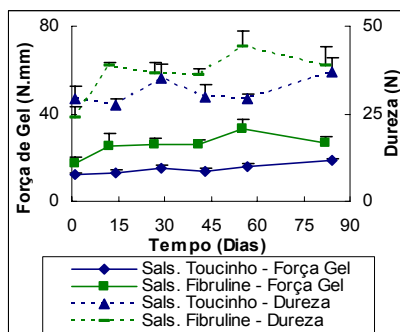


Figura 5 – Evolução da força de gel e da dureza ao longo do tempo de armazenagem

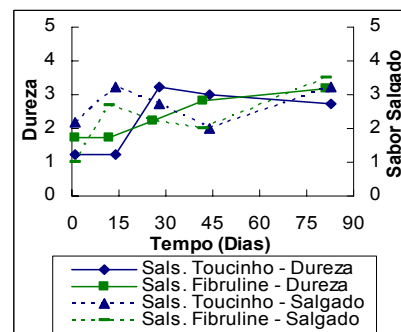


Figura 6 – Evolução sensorial da dureza e do sabor salgado ao longo do tempo de armazenagem

### 3.3. Estudo da estabilidade durante armazenagem

A força de gel e a dureza dos dois produtos estudados aumentaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) ao longo da armazenagem em refrigeração (Figura 5). O incremento da força de gel resultou de uma maior oposição à penetração e, portanto, reflectiu o endurecimento. Contudo, a evolução não foi tão intensa na salsicha de toucinho, sendo de realçar que a força de gel desta só começou a aumentar a partir do dia 43. Os outros parâmetros mantiveram-se estáveis durante a armazenagem. O endurecimento de salsichas foi igualmente verificado por outros autores, por exemplo, com Frankfurters de frango [11].

A avaliação sensorial revelou igualmente um endurecimento ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para as duas formulações (Figura 6). Adicionalmente, o sabor salgado da salsicha de Fibruline intensificou-se durante a armazenagem ( $p < 0,05$ ). As restantes propriedades sensoriais permaneceram inalteradas.

No aspecto microbiológico, as baixas contagens bacterianas mostraram a eficácia do tratamento térmico e da posterior armazenagem. Apenas as contagens totais das aeróbias mesófilas foram diferentes de zero, embora muito baixas. Em geral, o tempo de armazenagem não teve efeito nos parâmetros, porém, foi observado crescimento microbiano nos meios de detecção dos esporos de clostrídios sulfito-redutores, a partir do dia 45 (salsicha de toucinho) e do dia 43 (salsicha de Fibruline). Apesar das colónias não serem características, estas poderiam pertencer ao género *Clostridium*, uma vez que algumas estirpes de *C. botulinum* (em especial estirpes sacarolíticas no grupo II) não formam forçosamente colónias negras em tais meios [12]. Donde, este parâmetro foi considerado no estabelecimento do tempo de conservação útil.

## 4. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que é possível obter uma salsicha de peixe (sem carne de porco e toucinho) de textura aceitável combinando vários factores benéficos para a saúde: elevado teor em FD, baixo teor lipídico e os nutrientes do peixe. Quanto à estabilidade, usando como critério decisivo a segurança microbiológica foi estimado um tempo de conservação útil semelhante para cada produto: salsicha de toucinho, 27 dias e salsicha de Fibruline, 25 dias.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio técnico da Eng<sup>a</sup>. Ana Ribeiro (ESAS), a dádiva das fibras pela Eng<sup>a</sup> Cátia Silva (Induxtra De Suministros Portuguesa, Lda.) e o financiamento pelo projecto QCA III MARE-FEDER 22-05-01-FDR-00006 “Qualidade e Inovação em Produtos da Pesca”.

### Referências

- [1] – A. Yang, J.T. Keeton, S.L. Beilken, G.R. Trout - J. Food Sci. **66** (2001) 1039
- [2] – I. Sánchez, M. Pérez-Mateos, J. Borderías - **Marzo** (2004) 10
- [3] – C.E. Morris - Food Eng. **60** (1988) 49
- [4] – M.E. López-Caballero, M.C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos - J. Food Sci. **70** (2005) 166
- [5] – R. Puupponen-Pimä, A.M. Aura, K.M. Caldentey - Trends in Food Sci. & Technol. **13** (2002) 3
- [6] - H.H. Huss - Food Control **8** (1997) 91
- [7] – A.H.W. Hauschild, K.L. Dodds (ed.) - *Clostridium botulinum, Ecology and Control in Foods*, Marcel Dekker Inc., New York (1993)
- [8] – C. Cardoso, R. Mendes, M.L. Nunes – J. Aq. Food Prod. Technol. (a ser publicado)
- [9] – S.C. Murphy, D. Gilroy, J.F. Kerry, D.J. Buckley, J.P. Kerry - Meat Sci. **66** (2004) 689
- [10] – Z.E. Sikorski (ed.) – *Chemical and functional properties of food proteins*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster (2001)
- [11] – S.C. Andrés, M.E. García, N.E. Zaritzky, A.N. Califano – J. Food Eng. **72** (2006) 311
- [12] – ICMSF - *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens*, Blackie Academic and Professional, London (1996)

# OS POLISSACARÍDEOS DAS PAREDES CELULARES DA AMEIXA D'ELVAS E A ACTIVIDADE DE ENZIMAS ASSOCIADAS À SUA DEGRADAÇÃO COMO PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DA CONFITAGEM

*Nunes, C. \*, Saraiva, S., Coimbra, M. A.*

Universidade de Aveiro, Departamento de Química,

Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro

Tel +351-234370719 Fax +351-234370084 e-mail: [claudian@dq.ua.pt](mailto:claudian@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** Ameixa d'Elvas, polissacarídeos, pectinametilsterase, poligalacturonase, celulase

**Resumo:** Os polissacarídeos da parede celular de Ameixas d'Elvas (“Rainha Claudia Verde”) provenientes de dois pomares de fenótipo semelhante, Vila Viçosa e Cano, mas que dão origem a ameixas confitadas com texturas muito diferentes, foram estudados, e quantificada a actividade das enzimas associadas à sua degradação. A análise dos polissacarídeos, por extracção sequencial, mostrou que as ameixas do pomar do Cano possuíam polissacarídeos pécnicos mais facilmente solubilizados em água e polissacarídeos hemicelulósicos também mais solúveis em soluções alcalinas, do que as ameixas do pomar de Vila Viçosa. A quantificação das actividades das enzimas pectinametilsterase (PME), poligalacturonase (PG) e celulase (Cel) revelou que na altura da colheita para processamento, as ameixas do pomar do Cano tinham uma actividade inferior de PME e superior de PG e Cel, relativamente às do pomar de Vila Viçosa. A perda de firmeza dos frutos do pomar do Cano parece estar relacionada com um estado de maturação bioquímico mais adiantado, que não é detectável pelos parâmetros convencionais de avaliação da maturação.

## 1. INTRODUÇÃO

A Ameixa d'Elvas é um produto regional detentor de Denominação de Origem Protegida (DOP). Apenas as ameixas da variedade “Rainha Claudia Verde” produzidas numa área geográfica delimitada (Alto Alentejo) e num determinado estado de maturação podem ser utilizadas para a produção da Ameixa d'Elvas confitada. Contudo, dependendo do pomar, frutos com o mesmo estado de maturação (aspecto visual, sólidos solúveis totais, acidez total e acidez titulável) apresentam características de textura diferentes no produto final. Os frutos do pomar de Vila Viçosa dão origem a produtos de boa qualidade, enquanto os frutos do pomar do Cano originam produtos com menor firmeza, de qualidade inferior e reduzido valor comercial.

Os polissacarídeos das paredes celulares dos frutos estão associados à firmeza dos seus tecidos. Durante o amadurecimento dos frutos, as alterações ao nível da textura estão associadas a modificações nos polissacarídeos da parede celular, principalmente ao nível dos polissacarídeos pécnicos da lamela média, provocando a degradação da parede celular e a diminuição da adesão intercelular (1,2).

Este trabalho teve como objectivo contribuir para identificar as causas que levam a que frutos aparentemente num estado de maturação igual, resultem em produtos finais de qualidade muito dispar e encontrar marcadores que distingam os frutos com qualidade para serem confitados. Com este propósito, foram extraídos sequencialmente os polissacarídeos da parede celular da polpa da ameixa dos dois pomares (Vila Viçosa e Cano), cujos resultados foram relacionados com a quantificação da actividade de enzimas associadas à sua degradação, enzimas pectinametilsterase (PME), poligalacturonase (PG) e celulase (Cel).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Neste trabalho foram utilizadas ameixas da variedade "Rainha Claudia Verde" provenientes de dois campos, um situado em Vila Viçosa e o outro no Cano (Alto Alentejo). Foram recolhidas ameixas no mesmo estado de maturação, avaliado pela quantidade de sólidos solúveis totais, acidez total e acidez titulável.

### **2.2. Polissacarídeos da parede celular**

Os polissacarídeos da parede celular da polpa das ameixas foram extraídos sequencialmente, a partir do resíduo insolúvel em álcool (AIR), com água, imidazol, carbonato de sódio e KOH de concentração 0,5M, 1M, 4M e 8M, até obtenção de um resíduo rico em celulose (3). A quantificação dos açúcares neutros foi efectuada por GC-FID após hidrólise ácida e derivatização dos açúcares a acetatos de alditol (4,5). Os ácidos urónicos foram quantificados pelo método colorimétrico de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (6), tal como descrito por Coimbra *et al.*

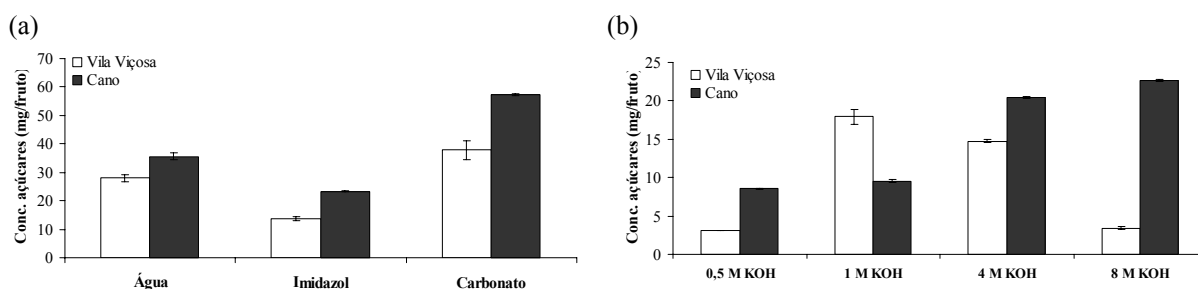
### **2.3. Actividade enzimática**

A extracção das enzimas foi realizada com tampão Tris/HCl a pH 7,0 (para extrair a fracção solúvel das enzimas - FS) e em seguida com tampão Tris/HCl a pH 7,0 contendo NaCl 1M (para extrair a fracção das enzimas ligada ionicamente à parede celular - FI). O resíduo sólido final foi usado para quantificar a actividade da fracção das enzimas ligada covalentemente à parede celular (FC). A actividade da PME foi determinada pela titulação dos grupos carboxílicos formados por unidade de tempo, usando como substrato soluções de pectina (3,5 g/L) a pH 7 e à temperatura de 25 °C, com um titulador automático (Crison micro TT2022). A actividade da PME foi expressa como a taxa de consumo de NaOH 0,01 M ( $\Delta V_{\text{NaOH}} / \Delta t$ ) para manter o pH a 7,0 (7). A actividade da PG foi quantificada pela formação de açúcares redutores, usando como substrato ácido poligalacturónico (4 g/L) a pH 4,4 e 35 °C, durante 10 minutos (8). A actividade de celulase foi determinada pela diminuição de viscosidade de uma solução de carboximetilcelulose 0,1 % (w/v), em tampão acetato 0,1M com pH 4, ao fim de 60 min de reacção a 30 °C. A viscosidade das soluções foi medida num viscosímetro capilar de 75 mm (tipo Cannon-Fenske) a 30 °C (9).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Polissacarídeos da parede celular**

A análise de açúcares dos extractos obtidos por extracção sequencial dos polissacarídeos com soluções aquosas e concentração crescente de solução alcalina, revelou que as ameixas são constituídas principalmente por polissacarídeos pécticos, cerca de 40% nas de Vila Viçosa e 45% nas do Cano. Quer no extracto com água, que solubiliza os polissacarídeos que se encontram livres na parede celular, quer no extracto de imidazol, que solubiliza os polissacarídeos pécticos associados por pontes de cálcio, quer no extracto de carbonato, que solubiliza os associados por ligações éster, a quantidade de açúcares extraídos por fruto foi superior nas ameixas do Cano (Figura 1a). A quantidade de açúcares extraídos com soluções de concentração crescente de KOH, que solubiliza os polissacarídeos hemicelulósicos, também foi superior na polpa das ameixas do Cano em todos os extractos, excepto para o extracto obtido com a solução 1 M KOH (Figura 1b). Estes resultados permitem verificar que há uma maior facilidade na solubilização, quer dos polissacarídeos pécticos, quer dos hemicelulósicos das ameixas do Cano do que das de Vila Viçosa.

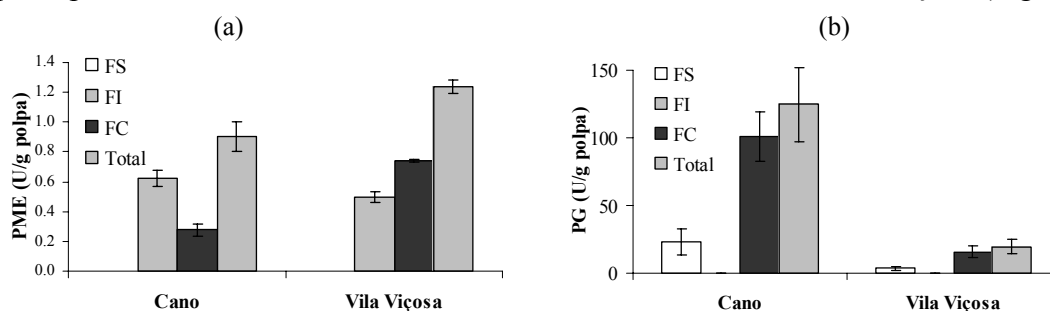


**Figura 1** - Quantidade total de açúcares nos extractos com água, imidazol, carbonato (a) e KOH (b) da polpa das ameixas de Vila Viçosa e do Cano.

### 3.2. Quantificação da actividade das enzimas

A actividade total da PME é superior (cerca de 30%) nas ameixas de Vila Viçosa em comparação com as do Cano. Nas ameixas do Cano a actividade na FI foi superior em relação à FC, enquanto que nas ameixas de Vila Viçosa se observou o inverso (Figura 2a).

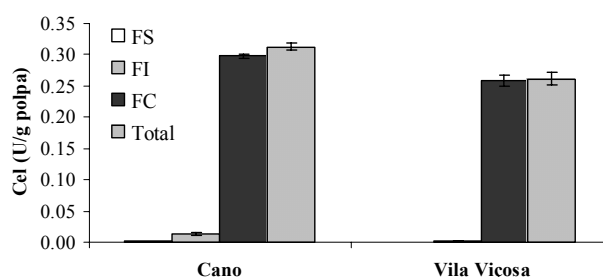
A actividade da PG foi apenas detectada na FS e FC, sendo a actividade superior na FC para as ameixas de ambos os pomares. As ameixas de Vila Viçosa apresentam uma actividade total de PG de apenas cerca de 15% da actividade quantificada nas ameixas do Cano, o que se deve principalmente à menor actividade da PG na FC das ameixas de Vila Viçosa (Figura 2b).



**Figura 2** – Actividade da PME (a) e da PG (b) na polpa das ameixas do Cano e Vila Viçosa.

A actividade da PME e da PG, ao longo do amadurecimento dos frutos, está relacionada com a degradação dos polissacarídeos pécnicos, sendo que a actividade da PME aumenta numa fase inicial do amadurecimento, causando desesterificação das pectinas, que constituirão então o substrato da PG. Assim, a actividade da PG começa a aumentar numa fase de amadurecimento mais avançada, indicando que esta enzima poderá ser induzida pelo substrato (10). Como nas ameixas de Vila Viçosa a actividade total da PME é superior à de PG, enquanto que para as ameixas do Cano se observa o inverso, as ameixas do Cano poderão estar num estado de maturação bioquímico mais avançado (com a actividade da PME numa fase de declínio).

A actividade de Cel corresponde basicamente à enzima existente no resíduo nas ameixas dos dois pomares, Vila Viçosa e Cano. A actividade total de Cel é superior nas ameixas do Cano (Figura 3). A actividade desta enzima pode ser responsável pela solubilização dos polissacarídeos hemicelulósicos, como as xiloglucanas, pelo que a actividade superior desta enzima nas ameixas do Cano, deverá estar relacionada com a maior quantidade de polissacarídeos hemicelulósicos solúveis destas ameixas.



**Figura 3** – Actividade de Cel na polpa das ameixas do Cano e Vila Viçosa.

#### 4. CONCLUSÃO

As ameixas do pomar do Cano apresentam polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos mais facilmente solubilizados do que as de Vila Viçosa. A quantificação da actividade das enzimas PME, PG e Cel indica que as ameixas do Cano deverão estar num estado de amadurecimento bioquímico mais avançado, em que a PME já actuou. A maior actividade da PG nas ameixas do Cano indica que os polissacarídeos pécticos deverão ter sido sujeitos de modo mais extenso à acção desta enzima. Assim, da acção da PME e PG, resultarão polissacarídeos pécticos mais solúveis nas ameixas do Cano e da acção da Cel, resultarão polissacarídeos hemicelulósicos mais solúveis, o que é suportado pelos resultados obtidos para a quantificação dos polissacarídeos. No entanto, como segundo os parâmetros convencionalmente usados para avaliar a maturação de frutos (sólidos solúveis totais, acidez total e acidez titulável), o estado de maturação das ameixas de ambos os pomares era semelhante, é necessário identificar outros parâmetros, que permitam uma mais adequada avaliação do estado de maturação das ameixas. As características dos polissacarídeos das paredes celulares e a actividade das enzimas envolvidas na sua degradação poderão ser parâmetros interessantes para esta avaliação, permitindo a identificação do estado de maturação adequado para permitir a confitagem da Ameixa d'Elvas.

#### Referências

- [1] - J.P. Van Buren - J. Texture Stud. **10** (1979) 1-23
- [2] - K.W. Waldron, A.C. Smith, A.J. Parr, A. Ng, M.L. Parker - Trends Food Sci. Technol. **8** (1997) 213-221
- [3] - M.A. Coimbra, I. Delgadillo, K.W. Waldron, R.R. Selvendran - Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. H.F.Linskens, J.F.Jackson (ed.) - *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg **17** (1996) 19-44
- [4] - A.B. Blakeney, P.J. Harris, R.J. Henry, B.A. Stone - Carbohydr. Res. **113** (1983) 291-299
- [5] - P.J. Harris, A.B. Blakeney, R. J. Henry, B.A. Stone - J. AOAC Int. **71** (1988) 272-275
- [6] - N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen - Anal. Biochem. **54** (1973) 484-489
- [7] - C. S. Nunes, S. M. Castro, A. Van Loey, J. A. Saraiva, M. A. Coimbra, M. Hendrickx - J. Food Biochem. **30** (2006) 138-154
- [8] - K.C. Gross - HortScience **17** (1982) 933-934
- [9] - S. Lohani, P. K. Trivedi, P. Nath - Postharvest Biol. Technol. **31** (2004) 119-126
- [10] - K. Wakabayashi - J. Plant Res. **113** (2000) 231-237



# POLIFENÓIS EM VEGETAIS DE USO TRADICIONAL NA COZINHA PORTUGUESA

Alua<sup>1</sup>, N.; Godinho<sup>1</sup>, I.; Catarino<sup>1</sup>, A.; Serra<sup>1,2</sup> (\*), M.C.

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

<sup>2</sup>Centro de Investigação em Engenharia Química e Biotecnologia, ISEL

Rua Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa

Tel +351-218 317 264 Fax +351-218 317 267 e-mail: [mcserra@deq.isel.ipl.pt](mailto:mcserra@deq.isel.ipl.pt)

**Palavras-chave:** polifenóis, Folin-Ciocalteu, ultrassons, vegetais de uso culinário

**Resumo:** A quantificação dos compostos fenólicos em extractos de couve galega, nabiça, acelga e rucola foi realizada por espectroscopia de absorção molecular no visível, segundo o método de Folin-Ciocalteu e recorrendo a uma curva de calibração com ácido gálico. A extracção dos polifenóis da matriz vegetal, fresca ou seca e previamente homogeneizada, foi realizada com etanol à temperatura ambiente e auxiliada através da aplicação de ultrassons. O teor em compostos fenólicos nos extractos das plantas frescas variou entre 16,8 e 8,8 mgAG/g matéria seca, apresentando os extractos de couve galega e nabiça a concentração mais elevada e com valor semelhante. Nos extractos de rucola observou-se o menor teor em polifenóis enquanto que nos de acelga se determinou uma concentração média de  $13,0 \pm 1,4$  mgAG/g matéria seca. A determinação dos compostos fenólicos nos extractos das amostras previamente sujeitas ao processo de secagem, conduziu a valores inferiores cerca de 70 a 80% aos determinados a partir das plantas frescas, com a excepção da rucola em que se observou uma redução de aproximadamente 45%.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos, presentes na maioria das plantas, desempenham funções biológicas muito diversas, de entre as quais se destaca uma importante actividade antioxidante [1].

Os antioxidantes reagem com os radicais livres resultantes do metabolismo celular, inibindo possíveis reacções de oxidação que danificam as células e actuando de modo a prevenir o aparecimento de doenças como o cancro, a diabetes e a aterosclerose.

Esta acção antioxidante, característica de alguns alimentos, designadamente frutos e vegetais, além de proteger os organismos que os utilizam dos efeitos oxidativos responsáveis pelo envelhecimento é, também, responsável por retardar processos de degradação em alimentos, sendo essenciais para a manutenção da qualidade e do valor nutricional destes produtos [1,2].

A procura de antioxidantes naturais que possam ser usados como conservantes na indústria alimentar, em alternativa aos obtidos por via química, é um assunto de grande interesse e actualidade sobre o qual se têm desenvolvido numerosos estudos numa grande diversidade de extractos de plantas, frutas e cereais ricos em polifenóis [1,2].

Considerando que a quantificação dos compostos fenólicos constitui, normalmente, o ponto de partida para a avaliação da actividade antioxidante, o objectivo do presente trabalho foi a determinação do teor em polifenóis nas folhas de couve galega (*Brassica oleracea*) e nabiça (*Brassica napus*), cujo consumo é frequente em Portugal mas também em folhas de acelga (*Beta vulgaris*) e rucola (*Eruca sativa*) que começam a ser cada vez mais utilizadas [3]. Pretende-se, deste modo, obter informações que possam contribuir para fomentar o consumo destes produtos como uma possível fonte de antioxidantes e, assim, conduzir à sua valorização junto do consumidor.

Os extractos de couve galega, nabiça, acelga e rucola foram preparados através da extracção com etanol e recorrendo a uma sonda de ultrassons no sentido de promover uma maior eficiência no processo. De facto, estudos já realizados, demonstram as vantagens do uso de ultrassons em processos de extracção de compostos com interesse na indústria farmacêutica e alimentar a partir de matrizes de origem vegetal [2]. Os ultrassons, ao promoverem a ruptura das paredes celulares, facilitam o contacto entre o solvente e a matriz e possibilitam a dissolução de componentes celulares [2].

A determinação dos polifenóis nos diversos extractos foi efectuada segundo o método de Folin-Ciocalteu [4,5,6] o qual é, frequentemente, utilizado na análise de alimentos e produtos naturais. O método fundamenta-se na reacção de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e o reagente de Folin, da qual resulta um complexo de molibdénio e tungsténio, de cor azul, que absorve a 765 nm. Para a aplicação deste método é necessário recorrer a um padrão que permita o traçado de uma curva de calibração, sendo o ácido gálico usado frequentemente com esse objectivo.

## **2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

As amostras de couve galega, nabiça e acelga foram recolhidas numa horta na zona de Lisboa e a rucola foi adquirida num mercado local, entre Setembro e Dezembro de 2006. Algumas das amostras foram sujeitas a um processo de secagem à temperatura de aproximadamente 40°C durante 24 a 48 horas. Em seguida, procedeu-se à respectiva moagem e pesaram-se fracções com uma massa de aproximadamente 0,25 g. As restantes amostras foram usadas em fresco e sujeitas a um processo de trituração, tendo sido retiradas fracções de massa entre 2,3 e 3,6 g.

Todas as fracções foram sujeitas a um método de extracção com 50 ml de etanol (Riedel, puriss. p.a.), à temperatura ambiente, e sonicadas com uma sonda de ultrassons (VCX-130 da Sonics & Materials, 20 kHz) durante cerca de 15 minutos.

Procedeu-se, em seguida, à quantificação dos compostos fenólicos totais nos extractos etanólicos através do método de Folin-Ciocalteu. Retiraram-se 50 µL de cada um dos extractos, juntaram-se 250 µL de reagente Folin (2N, Sigma) e perpez-se o volume a 4 mL com água. Após 5 minutos, adicionou-se 750 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Merck, p.a.) e colocou-se a mistura em banho de água (Haake NB22) a 40°C durante aproximadamente 30 minutos. Procedeu-se, em seguida, a medidas de absorvância a 765 nm num espectrofotómetro de UV-Vis de duplo feixe (ATI Unicam). Foi, previamente construída, uma curva de calibração usando soluções padrão de ácido gálico com concentrações entre 12,5 mg/L e 500 mg/L.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores do teor médio em polifenóis determinados nos extractos das folhas frescas, expressos em mg de ácido gálico por grama de matéria seca, são apresentados na Tabela 1 assim como a respectiva incerteza.

Conforme se observa na Tabela os extractos de couve galega e nabiça revelaram uma concentração semelhante em compostos fenólicos, a qual foi superior à encontrada nos extractos de acelga e rucola.

Tendo em consideração o intervalo de variação do teor em polifenóis determinado por outros autores [7] para um conjunto de vegetais de uso culinário ( 0,4 – 7,4 mg AG/g matéria seca) em que não estão incluídas as plantas em estudo neste trabalho, verifica-se que a couve galega, a nabiça e a acelga apresentam uma concentração em compostos fenólicos

significativamente superior o que poderá ser indicativo de uma promissora actividade antioxidante.

Tabela 1 - Teor médio em polifenóis (mg AG/g matéria seca)

|   |            |
|---|------------|
| Couve galega ( <i>Brassica oleracea</i> ) | 16,8 ± 0,8 |
| Nabiça ( <i>Brassica napus</i> )          | 16,8 ± 1,1 |
| Acelga ( <i>Beta vulgaris</i> )           | 13,0 ± 1,4 |
| Rucola ( <i>Eruca sativa</i> )            | 8,8 ± 0,7  |

A quantificação dos polifenóis em folhas secas de couve galega, nabiça e acelga, após sujeitas a um método de extracção semelhante ao usado na preparação dos extractos de folhas frescas, conduziu a valores cerca de 70 a 80% inferiores aos referidos na Tabela 1, enquanto que na rucola a redução observada foi de 45%. Embora a remoção da água possa conduzir a uma maior eficiência na extracção de alguns compostos fenólicos [2], o efeito da temperatura de secagem parece ser significativo na estabilidade dos polifenóis presentes nestas plantas.

No sentido de avançar nesta discussão, será importante realizar estudos sobre a composição química destas plantas, nomeadamente identificar os compostos fenólicos maioritários e comparar resultados provenientes da aplicação de diferentes condições de extracção.

### Referências

- [1] – M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, M. Heinonen - *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 3954
- [2] – S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, T. J. Mason - *Ultrasonics Sonochemistry* **11** (2004) 261
- [3] – F. Rocha - *Nomes Vulgares de Plantas Existentes em Portugal*, Direcção-Geral de Protecção das Culturas (1996)
- [4] – Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M.- *Antioxidants in Food*, CRC Press (2001)
- [5] – R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich – *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4290
- [6] – S. Otlés (ed.) – *Methods of Analysis of Food Components and Additives*, CRC Press (2005)
- [7] – M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, M. Heinonen– *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 3954

## LOUISIAN'S RED CRAWFISH IN PORTUGAL: FROM ENVIRONMENTAL PLAGUE TO FOOD ASSET.

Martins, P.M.; Nunes, B.A.<sup>2\*</sup>, Balcão, V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Bioengenharia e FarmacoClínica (CBFC), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Praça 9 de Abril n° 349, P-4249-004 Porto, Portugal; \*E-mail: [vbalcao@ufp.pt](mailto:vbalcao@ufp.pt);

<sup>2</sup>Centro de Modelagem e Análise de Sistemas ambientais (CEMAS), Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Fernando Pessoa, Praça 9 de Abril n° 349, P-4249-004 Porto, Portugal; \*E-mail: [bruno@ufp.pt](mailto:bruno@ufp.pt);

Louisiana's red crawfish, whose scientific name is *Procambarus clarkii*, possesses a great adaptability to changing environmental factors and a great resistance to adverse conditions (Gutiérrez-Yurrita *et al.*, 1999), and these are the main reasons why this organism is widely disseminated throughout the national territory (Correia, 1995).

This sweet-water crustacean was introduced in Portugal due to the interest raised by its potential as a food source, and also because of its predatory function, within the scope of protection of agricultural crops against infestating parasites (Anastácio, 1995). Being of a resistant nature, the sustained production of this organism from nutrient sources easily accessible and of reduced cost, will result in the capacity of assuring a total autonomy departing from natural sources of supply of this crustacean, which constitute the predominant commercial origin of the fresh-water crawfish.

Therefore, the large-scale production of animal protein, aiming at being incorporated in formulations for human feeding (surimi), or as animal feed (eventually replacing fish flour) when in excess production, constitutes a high-added value for this organism which is currently an infestating plague of generalized dissemination within the national territory.

In this research effort, we present data pertaining to the nutritional aspects of Louisiana's red crawfish, after formulation and optimization of a diet using easily (natural) accessible and relatively cheap ingredients, which produced the highest percent increase in the crustacean body weight. The diets formulated, incorporating different percentages of carbohydrate and protein, namely potato and soy, rice and soy, and pasta and soy, led to a generalized increase in the crawfish weight, but the one consisting of pasta and soy led to the greatest overall increase in body weight. To our knowledge, the results presented in this research work are somewhat pioneering and lead to promising commercial valorisation of this aquatic organism, currently considered more an environmental plague than an asset.

### References

- Gutiérrez-Yurrita, P. J., Martínez, J. M., Ilhéu, M., Bravo-Utrera, M. A., Bernardo, J. M. and Montes, C., 1999. The status of crayfish populations in Spain and Portugal. In: Gherardi, F and Holdich, D.M, Editors, 1999. *Crayfish in Europe as Alien Species. Crustacean Issues 11*, A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 161–192.
- Anastácio, P. M. and Marques, J. C. (1995) Population biology and production of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the Lower Mondego river valley (Portugal) *Journal of Crustacean Biology* 15 (1): 156-168.
- Correia, A. M. and Ferreira, O. (1995) Burrowing behaviour of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal. *Crustacean Biology* 15: 248–257.

# RELATIONSHIP BETWEEN ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC CONTENT OF MADEIRA TABLE WINES

*Paixão, N.<sup>1</sup>, Perestrelo, R.<sup>1</sup>, Pereira, V.<sup>1</sup>, Marques, J.C.<sup>1</sup>, Elias, J.<sup>2</sup>,  
Câmara, J.S.\*<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Centro de Química da Madeira, Departamento de Química, Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal. Portugal.

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de La Laguna, Canarias. Tel +351-291 705 100 Fax +351-291 705 149 \*e-mail: jsc@uma.pt

**Keywords:** Phenolic, antioxidant capacity, ABTS<sup>+</sup>, DPPH.

**Abstract:** Phenolic compounds are one of the most important quality parameters of wines, since they contribute to wine organoleptic characteristics such as colour, astringency, and bitterness. Furthermore, several studies have pointed out that many show biological properties of interest, related to their antioxidant capacity. This antioxidant activity has been thoroughly studied and a wide variety of methods have been developed to evaluate it.

In this study, we have tried to determine the antioxidant capacity by different analytical methods and correlate them with the total phenol content, determined by ABTS<sup>+</sup> radical cation decolourisation, the DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu's reagent respectively.

The total polyphenol concentration was found to vary from 252 to 1936 mg/l gallic acid equivalents (GAE). The antiradical activity varied from 0,042 to 0,715 mM Trolox equivalents and the antioxidant capacity varied from 344 to 1105 mg/l galic acid equivalents (GAE). For the Reduction Power we obtained 3.45 mM to 3.86 mM Quercetin equivalents.

## 1. INTRODUCTION

Grapes contain a large amount of different phenolic compounds in skins, pulp and seeds, that are partially extracted during winemaking. Those molecules play an important role in some sensory properties of grapes and wines, such as astringency and colour. Flavonoids and other phenolic compounds in plants have received much attention in the prevention of human neurodegenerative diseases such as cardiovascular disorders and cancer. These properties of red wines have been correlated with their content in flavan-3-ols, anthocyanins and acid tannic, although it is believed that the antioxidant properties are linked with the total polyphenol concentration rather than individual polyphenols.

The moderate consumption of wine, especially red wine, has also recently been associated with the reduction in mortality from cardiovascular diseases, an effect that is commonly known as the "French Paradox".<sup>[1]</sup> The polyphenolic compounds present in wines, which are known to have a high antioxidant capacity, are the components recently attributed with providing the protective activity against these diseases.

Most of the methods described in the bibliography for determining antioxidant capacity are based on the study of a reaction in which a free radical is generated and how this reaction is inhibited by the addition of the compound or sample that is the object of the measurement of antioxidant power. A rapid and simple method to measure the antioxidant activity of foods utilizes the stable DPPH radical. Is one of a few stable and commercially available organic nitrogen radicals and has UV-Vis absorption at 515 nm. For the antiradical activity, one of the most frequently used methods is based on the generation of the highly stable chromophoric

cation-radical of ABTS, and the ability of the presumed antioxidant either to delay its appearance or to capture it and diminish its absorbance.<sup>[2]</sup> Total phenols and polyphenols are usually quantified by employing Folin-Ciocalteu's reagent. This procedure is also employed in the wine industry, where gallic acid is usually selected as a standard.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Wines

Eleven representative (five red wine, one rosé wine and five white wine), high-quality, regional wines were examined, which were produced according to standard procedures. All samples were of 2005 vintage and all the analysis was carried out in triplicate.

### 2.2. Chemicals

2,2-Azino-bis-(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the crystallized diammonium salt form, Folin reagent, Gallic acid, Potassium persulfate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in free radical form, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchloroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-dipyridyl, Trichloroacetic acid (TCA), Citric acid from Fluka, Sodium tartrate, Iron chloride were from Riedel de Haën, Sodium Carbonate from Panreac and Methanol 99.9% purity from Sigma Aldrick.

### 2.3. Equipment

The equipment used in this work was a Perkin Elmer Lambda 2 spectrometer. All samples were analysed in 10 mm quartz cells at room temperature.

### 2.4. Determination of Total Polyphenols Content (TPC)

The total phenolic contents of wine samples were determined with the Folin-Ciocalteu's reagent<sup>[3]</sup>, using gallic acid as standard. To 1 ml of wine sample (adequately diluted), 0.25 ml of carbonate-tartrate solution (20 g of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1.2 g of Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O in 100 ml of distilled water) and 0.025 ml of Folin-Ciocalteu's reagent were added. The absorbance of the sample was measured at 700 nm after 30 min of reaction. The results were expressed as mg of Gallic acid equivalents (GAE) l<sup>-1</sup>.

### 2.5. Measurement of the Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of wine samples in the reaction with stable ABTS<sup>•+</sup> radical cation was determined according to Re *et al*, (1999) method<sup>[4]</sup> with slight modification. ABTS<sup>•+</sup> was produced by reacting 2 mM of 2,2-Azino-bis-(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diamonium salt (ABTS) with 70 mM of potassium persulfate in 50 ml of phosphate buffered saline (PBS). The mixture was left to stand in the dark at room temperature for 15-16 hours before use. For the evaluation of the activity, the ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with PBS to obtain the absorbance of 0.800±0.030 at 734 nm. Then 12 µl of wine sample were mixed with 3 ml of ABTS<sup>•+</sup> solution. The absorbance was read at room temperature during 20 min. PBS solution was used as a blank sample. The percentage decrease of the absorbance at 734 nm was calculated by the formula  $I = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$ , where I = ABTS<sup>•+</sup> inhibition %, A<sub>B</sub> = absorbency of a blank sample (t = 0 min), A<sub>A</sub> = absorbency of a tested wine at the end of the solution (t = 20 min).

### 2.6. DPPH radical scavenging assay

In the presence of an antioxidant the purple colour of DPPH is fading; the change of absorbency can be followed spectrophotometrically. Free radical scavenging activity (A<sub>AR</sub>) of

studied wines was determined using the DPPH method.<sup>[5]</sup> An aliquot of adequately diluted samples (1:10 with an ethanolic solution – 12% in KCl/HCl 0.2 M buffer, pH 2.0) was added to 0.975 ml DPPH solution (0.06 mM in MeOH) and vortexed. The absorbency of the remaining DPPH was determined after 60 min at 515 nm. The radical scavenging activity was calculated by the formula  $A_{AR}$  (mM TRE) = 0.192 x ln (% $\Delta A_{515}$ ) – 0.143, as determined from the linear regression, after plotting ln(% $\Delta A_{515}$ ) of known solutions of Trolox<sup>®</sup> against concentration (mM), where % $\Delta A_{515}$  = [( $A_{515(0)}$  -  $A_{515(60)}$ ) /  $A_{515(0)}$ ] x 100.

### 2.7. Measurement of the Reduction Power ( $P_R$ )

For the determination of the reducing power of wines a protocol based on the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay was developed.<sup>[6]</sup> The ferrous ( $Fe^{2+}$ ) ion produced from the redox reaction forms a coloured product with 2,2-dipyridyl which has a  $\lambda_{max}$  at 525 nm (Makris et al, 2000). An aliquot of 0.25 ml of wine appropriately diluted was mixed with 0.25 ml of 3 mM  $FeCl_3$  in 5 mM citric acid. The mixture was vortexed and incubated at 50° C in a water bath, for 20 min. Following this, 4.5 ml of 0.5% 2,2-dipyridyl in 1.2% TCA was added, the mixture was vortexed, and after 5 min the absorbance was read at 525 nm. Reducing power ( $P_R$ ) was expressed as quercetin equivalents (mM QE) from the following equation:  $P_R$  (mM QE) = 0.714 x  $A_{525}$  – 0.018) x  $F_D$  as determined from linear regression, where  $F_D$  is the dilution factor.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of all methods analysed in table Madeira wines, are presented in Table 1.

Table1  
Contents of total phenolics, Reduction power and antioxidant capacity values of table Madeira wine samples

| Wines | Main Variety | TPC (mg/l GAE) | $A_{AR}$ (mM TRE) | TAP (mg/l GAE) | $P_R$ (mM QE) |
|-------|--------------|----------------|-------------------|----------------|---------------|
| VT-1  | TNM          | 1827           | 0.67              | 732            | 3.59          |
| VT-2  | TNM          | 1871           | 0.58              | 793            | 3.45          |
| VT-3  | TNM          | 1853           | 0.56              | 903            | 3.62          |
| VT-4  | Sauvignon    | 1936           | 0.69              | 920            | 3.79          |
| VT-5  | T. Nacional  | 1724           | 0.71              | 1105           | 3.86          |
| VR-1  | TNM          | 665            | 0.24              | 502            | 1.37          |
| VB-1  | Verdelho     | 370            | 0.06              | 344            | 0.58          |
| VB-2  | Verdelho     | 372            | 0.04              | 425            | 0.49          |
| VB-3  | Verdelho     | 282            | 0.04              | 439            | 0.44          |
| VB-4  | Verdelho     | 389            | 0.05              | 508            | 0.60          |
| VB-5  | Malvasia     | 434            | 0.08              | 431            | 0.67          |

GAE: Gallic acid equivalents; TRE: Trolox equivalents; QE: Quercetin Equivalents

There was a wide range of phenol concentrations in the wines analyzed as shown in table 1. The values of TPC varied from 1724 to 1936 mg/l, averaging 1842 mg/l, for the red wines

and 282 mg/l to 434 mg/l, averaging 369 mg/l for the white wines. For rosé wine we obtained 665 mg/l (GAE).

The radical scavenging activity of wines in the DPPH reaction system were from 0.56 mM to 0.71 mM averaging 0.65 mM for the red wines, 0.04 mM to 0.08 mM averaging 0.06 mM for the white wines and 0.24 mM (TRE) for rosé wine. In the ABTS<sup>+</sup> reaction system, the values varied from 732 mg/l to 1105 mg/l averaging 891 mg/l for the red wines, 344 mg/l to 508 mg/l averaging 429 mg/l for the white wines and 502 mg/l (GAE) for the rosé wine. P<sub>R</sub> thus determined ranged from 3.45 mM to 3.86 mM averaging 3.66 mM for the red wines, 0.44 mM to 0.67 mM averaging 0.56 mM for the white wines and 1.37 mM (QE) for the rosé wine. Total antioxidant potencial, by DPPH method using Trolox as standard, could be a practical and simple measurement to evaluate the characteristics of different Madeira table wine.

In this work it was verified that de red wines have higher TPC levels than white and rosé wines and the same is obtained for antiradicalar activity and antioxidant capacity.

The addition of different amounts of antioxidant to the DPPH solution induced a rapid decrease in the optical density at 515 nm. The results of investigation shows that the higher the concentration of antioxidant, the lower the amount of remaining DPPH<sup>•</sup> and the higher the free radical scavenging activity. The same is observed for the ABTS<sup>+</sup> radical cation.

#### **Acknowledgements:**

This research work was supported by FEDER, program INTERREG IIIB (project ANTIVINMAC). The authors are grateful to Instituto do Vinho Madeira and Madeira Wine Company for the supply of the samples used in the study.

#### **References:**

- [1]– S. Renaud, M. De Lorgeril – *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. The Lancet **339** (1992) 1523.
- [2]– J.N. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley, C.A. Rice-Evans – *Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls*. FEBS Lett. **384** (1996) 240.
- [3]– R.C. Rossana, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G.M. Pastore, N. Durán – *Phenolic compounds and total antioxidant potencial of commercial wines*. Food Chem. **82** (2003) 409-416.
- [4]– R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans – *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay*. Free Radical Bio. Med. **26** (1999) 1231.
- [5]– D.M. Makris, E. Psarra, S. Kallithraka, P. Kefalas – *The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines*. Food Res. Int. **36** (2003) 805.
- [6]– R. Pullido, L. Bravo, F. Saura-Calixto – *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 3396.



# STORAGE STABILITY OF A SAFER *OVOS MOLES* FORMULATION: TEXTURE AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT

Fundo, J., Quintas, M., Brandão, T. and Silva, C.\*

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa

Rua Dr. António Bernardino de Almeida

4200-072 Porto, Portugal

Tel +351-225580058 Fax +351-284388207\*e-mail: [clsilva@esb.ucp.pt](mailto:clsilva@esb.ucp.pt)

**Keywords:** *ovos moles*, pasteurised egg, storage stability, texture and microbiological quality

**Abstract:** *Ovos moles* is a traditional Portuguese sweet confectioned with egg yolk, sugar and water. With the objective of increasing the safety of such product, pasteurised liquid eggs may be used in *ovos moles* production. Due to previous heat treatments, pasteurised liquid eggs present different properties, namely with respect to nutritional and physical properties. These alterations can be responsible for changes in *ovos moles* behaviour during storage. In this work, the physicochemical and microbiological behaviours of a traditional formulation against an alternative one produced with pasteurised eggs were studied.

Results allowed characterising the behaviour of traditional and alternative formulations, and the determination of an optimal storage temperature for both traditional *ovos moles* and pasteurised eggs formulation.

## 1. INTRODUCTION

*Ovos moles* is obtained through the mixture of uncooked egg yolk with a syrup of fine white sugar (sucrose), submitted to a few minutes of soft heating. To provide the typical structure, colour, aroma, smoothness and consistency, the added egg yolk must be uncooked. This can be considered the main safety issue associated with the origin of foodborne outbreaks caused by pathogenic microorganisms [1]. A previous study proposed the use of pasteurised eggs in *ovos moles* production [2]. However, changes in a food product composition may drastically modify specific product characteristics and behaviour during storage. Therefore, knowledge of microbiological spoilage and changes in quality parameters perceived by the consumers along storage is critical. Storage conditions, mainly storage temperature, are responsible for food quality alterations, namely in textural and nutritional characteristics and microbial load [3, 4], and therefore should be investigated. The objective of this work was to evaluate and compare the stability of conventional and previously developed *ovos moles* formulations [2], during storage at different temperatures. To achieve that, quality attributes like texture and microbial parameters were evaluated along storage period. Also changes in intrinsic attributes like pH and water activity were monitored.

## 2. MATERIAL AND METHODS

**Samples preparation:** *Ovos moles* samples used in this study were prepared following the typical recipe. Thus, 240 g of white sugar and 125 ml of water were heated until formation of a syrup with specific characteristics (maximum temperature approximately 105°C [5]). A volume of 220 ml of eggs were incorporated into the syrup. For conventional *ovos moles* preparation, raw shell eggs were acquired in a local supermarket, the yellow and white parts separated by hand and egg yolk was added to the syrup. Pasteurised *liquid eggs* (pasteurised yolk and white parts (80:20 v/v %), *Derovo*, Portugal) were used in the preparation of the new

formulation [2]. In both cases, total egg content was maintained constant. For each formulation, two different batches were prepared and analysed. Samples were stored at four different temperatures (6, 26, 30 and 37°C) for 59 days. These temperatures were representative of refrigerated conditions, room temperature and levels of temperature abuses that may occur in *ovos moles* distribution chain. Samples used in microbiological analysis were stored in sterilised “stomacher” bags. For the rest of the determinations, samples were stored in closed containers.

**Water activity and pH:** Water activity and pH changes along *ovos moles*’ storage were monitored. Water activity of each batch of each formulation stored at different temperatures was measured every 7 days along total storage time, using a dew point hygrometer (Aqualab - Series 3, Decagon Devices Inc., USA.), at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Calibration was previously carried out with distilled water and saturated saline solutions. Samples pH was measured after preparation and at the end of 59 days of storage. Three replicates of each batch were analysed directly using a pH meter (GLP 22, Crison, Spain).

**Texture assessment:** Indirect texture assessment was performed using rheological studies. The rheological behaviour of samples stored at different temperatures was determined every 7 days along storage. A controlled stress rheometer Bohlin VOR (Bohlin Instruments Ltd, Cirencester UK) at  $25^\circ\text{C}$ , with a 20 mm parallel plate configuration was used. Due to the large particle size, the gap was set to 2 mm. In accordance with a previous creep test, 2 minutes delay was given before testing to allow shear history relaxation and to reconfigure the initial state. All measurements were done in the viscoelastic region (strain was  $1 \times 10^{-3}$ , according to previous strain sweep tests). Dynamic rheological properties were investigated by applying oscillatory dynamic testing and measuring complex viscosity. This frequency sweep test was performed in the 0.1 to 10 Hz range. Dynamic measurements of each batch of each formulation were replicated at least six times.

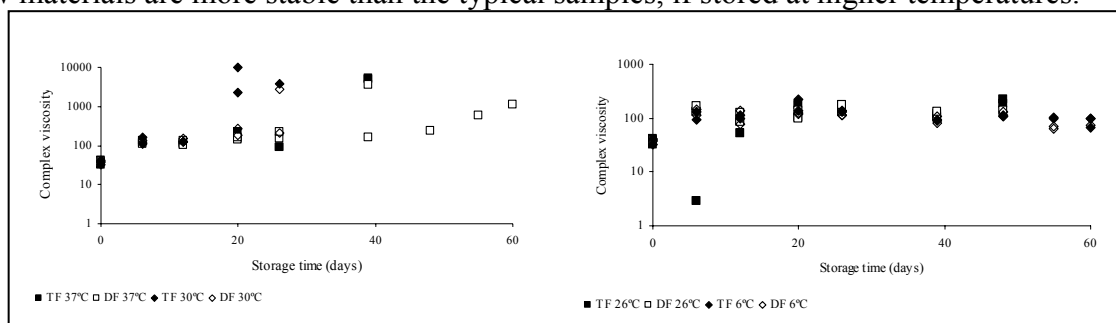
**Microbiological determinations:** *Ovos moles* microbial load was assessed along storage, at different storage temperatures, throughout the enumeration of total plate count (for both mesophiles and psychrotrophics) following ISO 4833:1991.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**Physicochemical analysis:** Results showed that the developed formulations present higher water activity than the traditional formulation, due to egg white addition [2]. Samples stored at lower temperatures (6 and  $26^\circ\text{C}$ ) did not revealed changes in water activity during storage (approximately 0.87). However, samples stored at higher temperatures (30 and  $37^\circ\text{C}$ ) presented a decrease in water activity. Concerning pH measurements, and for shorter storage time periods, typical formulations present pH values around 6.5, while pasteurised *ovos moles* formulations showed values higher than 7. This fact is due to egg white part addition [2]. Also, the standard deviation observed was very small, which can be due to electrode’s lack of sensitivity for materials of high viscosity. Different pH values were obtained at the end of the storage period, at different temperatures. However, these differences were small and are not expected to influence samples’ texture and microbial behaviour along storage.

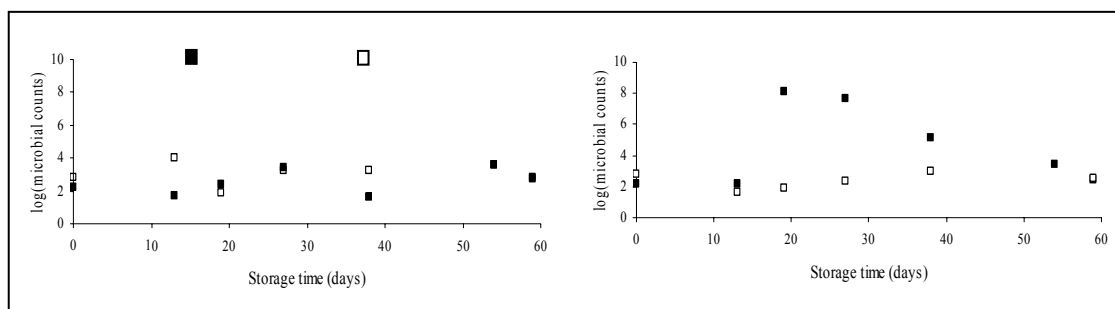
**Texture assessment:** Rheological determinations revealed viscoelastic behaviour of both studied *ovos moles* formulations, with independent frequency behaviour (results not shown). Changes on rheological behaviour of typical (TF) and developed (DF) formulations, along storage at different temperatures, was compared using complex viscosity, since it reflects simultaneously both elastic and viscous components of the observed behaviour [6]. Results of complex viscosity evaluated at 8 Hz are presented in Figure 1. It is possible to observe that storage temperature influenced samples’ behaviour. Complex viscosity of samples stored at

lower temperatures (6 and 26°C) remained approximately constant long 59 days of storage (~100 Pa.s). Such behaviour was observed in both formulations, i.e. the stability of *ovos moles* stored at such temperatures was similar for both typical and developed formulations. In samples stored at higher temperatures (30 and 37°C), rheological behaviour changed along storage time and differences between formulations behaviour were found. In typical *ovos moles*, complex viscosity increased after 20 days of storage (from ~50-100 till a maximum of 1000 Pa.s). In the developed formulation samples, such increase was not so evident and occurred later. These observations may indicate that *ovos moles* produced with pasteurised raw materials are more stable than the typical samples, if stored at higher temperatures.



**Figure 1.** Dynamic behaviour of *ovos moles* formulations stored at **a)** 37 and 30°C, and at **b)** 26 and 6°C (average values of complex viscosity at 8Hz of frequency).

**Microbiological determinations:** From the results of microbiological determinations of stored *ovos moles*, it was not possible to observe differences between the conventional (TF) and developed (DF) formulations behaviour. This result indicates that from a microbiological quality point of view, both formulations are identical. However, the formulations prepared with pasteurised egg yolk can be considered safer, since the absence of *Salmonella* sp is guaranteed [7]. However, the effect of storage temperature was evident and the obtained results are important for establishing temperature conditions throughout the distribution chain for both formulations, indistinctively. For samples stored at 6°C, total psicotrophics counts were determined. No psicotrophics counts were obtained for samples after preparation and no growth was observed along the 59 days of storage, indicating the absence of such microorganisms in the samples. Total mesophiles load was determined for samples stored at all four temperatures (6, 26, 30 and 37°C). For *ovos moles* stored at 6 and 26°C, it was possible to observe that the total mesophiles load remained approximately constant around  $\sim 10^2 - 10^3$  cfu/g (example in Figure 2 a)). This result is not surprising for samples stored at 6°C, where no growth of mesophiles is expected to occur. However, in samples stored at 26°C, it was expected mesophiles presence/growth. The observed result may be due to several factors like: i) synergetic effects between high sugar content and storage temperature, or ii) antagonist factors between bacteria and other microorganisms. With respect to higher storage temperatures (30 and 37°C), different batches presented different behaviours (example in Figure 2 b)). While for one batch the total mesophiles counts also remained constant, for the other it was possible to detect an increase in the number of viable cells, from  $\sim 10^2 - 10^3$  cfu/g till a maximum of  $10^8$  cfu/g. This occurred in both formulations for storage periods from 27 days or longer. After this period, a decrease in total mesophiles was observed, which may be due to other microorganisms competition [8, 9] or the effect of samples water activity changes [4].



**Figure 2.** Experimental results of total mesophiles counts in typical *ovos moles* formulation, during storage at a) 26°C and b) 30°C

The observed differences in batches from the same formulation may be a consequence of different factors: the knowledge and control of the initial microbial load is difficult due to the inherent heterogeneity of intact shell eggs; the pasteurisation process is not able to guarantee products with the exact same microbial profile, since it can only assure the inactivation of a target microorganism [10, 11, 12]. Moreover, total mesophiles enumeration includes all microorganisms able to grow in the temperature range 10 to 45°C (optimum at 35°C), which includes a large range of microorganisms [4].

#### 4. CONCLUSIONS

The behaviour of typical and alternative *ovos moles* samples during storage at different temperatures was characterised. Storage temperature effect was evident in water activity, texture and microbial load, for long storage periods. Comparing formulations, no differences were attained with respect to microbial load. However, at higher temperatures texture was better retained for samples prepared with pasteurised eggs. From the obtained results it was possible to infer advantages on using pasteurised eggs in *ovos moles* production: besides the above mentioned fact of higher texture retention, these raw materials are effectively safer with respect to pathogen microorganisms, like *Salmonella* spp., and are also easier to handle, avoiding contaminations. Results also allowed concluding on the optimum storage temperature of *ovos moles*: the general use of refrigerated distribution chain is unnecessary, since both texture retention and microbiological load are identical at room temperature. This conclusion may allow for reducing costs in marketing either conventional or pasteurised *ovos moles*.

#### References

- [1] - J. L. Schoeni, K. A. Glass, J. L. McDermott, A. C. L. Wong - Int J. Food Micro. **24**(3) (1995), 385-396
- [2] - J. F. Fundo, M. A. C. Quintas, T. R. S. Brandão, C. L. M. Silva - J. Texture Studies (2006) (submitted)
- [3] - T. P. Labuza - *Shelf-Life Dating of Foods*. Food & Nutrition Press, Inc., St. Paul, Minesota (1970)
- [4] - R. Bibek (3<sup>rd</sup> ed) - *Fundamental Food Microbiology*, CRC Press LLC, Boca Raton (2000)
- [5] - R. Lees, E. B. Jackson - *Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture*, Chemical Publishing, New York (1975)
- [6] - J. F. Steffe (1<sup>st</sup> ed) - *Rheological Methods in Food Processing Engineering*, Freeman Press, East Lansing, MI (1992)
- [7] - P. Manas, R. Pagan, I. Alvarez, S. Condon Uson, Food Micro. **20**(5) (2003) 593-600
- [8] - J. M. Jay - Trends Food Sci. & Technol. **8**(12) (1997) 421-424
- [9] - J. G. Burgess, E. M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns-Spragg, K. G. Boyd - J. Biotech. **70**(1-3) (1999) 27-32
- [10] - K. Ince, L. Kormendy, I. Kormendy, G. Zsarnoczay - Meat Sci. **51**(2) (1999) 115-121
- [11] - F. M. Silva, P. Gibbs, M. C. Vieira, C. L. M. Silva - Int. J. Food Micro. **51**(2-3) (1999) 95-103
- [12] - S. Denys, J. G. Pieters, K. Dewettinck - In M. L. A. Hertog, B. M. Nicolai, L. M. M. Tijskens, *Proceedings of the 3rd International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain* (2005)

## SYSTEMATIC EVALUATION OF PORTUGUESE TRADITIONAL FOODS

*Santos, M.; Dias, M.G.; Costa, H.S.*

Centro de Segurança Alimentar e Nutrição (CSAN), Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
(INSA)  
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa – Portugal (e-mail:helena.costa@insa.min-saude.pt)

There are many different cultures, within Europe, each with their own, distinct, dietary habits. Traditional foods include foods that have been consumed locally or regionally for a long time (before the Second World War) and the methods of preparation of such foods have been passed down through generations. As such, there is little documented information about the precise composition of these foods.

Therefore, there is a real need for investigation and registration of traditional foods to preserve nation's culinary heritage and culture and, if possible, enrich and improve the dietary habits across the whole continent.

A key objective of EuroFIR project [1], the world-leading European Network of Excellence on Food Composition Databank systems, is to provide new data on the nutritional composition of traditional foods for inclusion in national food composition tables and database. In this project, it was decided that each country would select 5 different traditional foods or primary products to be analysed. To achieve this, an EuroFIR consensus based method was applied for the systematic evaluation of traditional foods or recipes.

The method included the following steps:

- To define and reach an agreement on the term “traditional”, in 13 European countries, compiling country specific legislative and regulatory information.
- To elaborate a list of “traditional foods”, including those officially registered at national or European level, as well as those not registered.
- To provide an historical and folkloric review to document the traditional identity of foods.
- To elaborate a prioritized list of 5 foods, representing a full meal course consisting of one starter, two main dishes, a desert and one other special food, the following criteria were applied:
  - Frequency consumption
  - Availability or not of composition data for that food/ingredient
  - Positive health effects
  - Marketing potential
- To record traditional production methods used by local inhabitants with audiovisual means and collection of laboratory samples.
- To perform chemical analysis to determine the nutrient value of traditional foods.
- To disseminate data to various users: research scientists, health professional bodies, EU agro-food industry and retail groups, policy makers, consumer groups and teachers, food and health professionals and associations.

For Portugal the following five traditional foods (Green Cabbage Soup; Codfish with Chick-Peas; Portuguese Boiled Dinner; Roasted Goat Kid; Egg Sweet from Murça) were prioritized applying the criteria described above.

In conclusion, applying this method revealed the existence of an enormous quantity of traditional foods in Portugal, as well as recipe documentation. No classification system exists

for recipes considered as traditional. There is a lack of composition data for these traditional ingredients and foods.

[1] EuroFIR [homepage on the Internet]. U.K. Available from: <http://www.eurofir.net>

*This work was completed on behalf of the EuroFIR consortium and funded under the EU 6<sup>th</sup> Framework Food Quality and Safety Programme; Project contract No: FOOD-CT-2005-513944.*

## VOLATILE COMPOUNDS OF “CASTELO BRANCO” DOP CHEESE

*Ferreira<sup>1\*</sup>, I.M.P.L.V.O.; Pinho<sup>1,2</sup>, O.; Sampaio<sup>1</sup>, P.*

<sup>1</sup> REQUIMTE- Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4099-030 Porto; Portugal

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal  
isabel.ferreira@ff.up.pt

“Castelo Branco” cheese is a Portuguese DOP cheese made from raw ewe’s milk and vegetable coagulant, *Cynara cardunculos*, L, ripened for at least 40 days. The choice of ovine race can influence fat milk composition and consequently the flavour of “Castelo Branco” DOP cheese. During ripening the hydrolysis of milk triglycerides into free fatty acids by microorganisms and native milk lipases is an important phenomenon in the development of flavour, since the native lipase is not deactivated by pasteurization. The short chain volatile fatty acids, possessing strong odours serve as precursors of other flavour compounds, such as, esters, ketones, alcohols and others. No studies were found with respect to the influence of ewe’s race in the quality of this cheese.

The aim of this work has been to compare the volatile profile and sensory characteristics of 36 samples of “Castelo Branco” cheeses produced in winter season with milk of three breeds from Merino, Assaf and crusade races. A similar diet was give to the three breeds before milk production.

Volatile compounds profile was assayed by SPME analyses with carboxen-polydimethylsiloxane fiber applied to cheese headspace. The absorbed analytes were thermally desorbed in the injector of a gas chromatograph for separation and quantification. Detection was by mass spectrometry and volatile compounds were identified by comparing the experimental spectra with those of the NIST’ 98 data bank.

A total of 69 volatile compounds were separated and identified that include 11 acids, 12 esters, 13 alcohols, 7 hydrocarbons, 6 aromatic components, 10 ketones, 1 aldehyde, 6 sulphur compounds, 1 ether, 2 alicyclic compounds. Multivariate statistical analyses showed that chesses produced from milk of Merino race distinguished from others owing to its higher content of short chain acids, esters and aromatic compounds. Good correlation was obtained with sensory analyses.





## **4. SEGURANÇA, TOXICOLOGIA E VALOR NUTRICIONAL**

### **4.1 Sessão Plenária**

**Segurança Alimentar *versus* Insegurança do Consumidor**

### **4.2 Sessão de Comunicações Orais**

### **4.3 Sessão de Comunicações Orais de Painéis**

### **4.4 Painéis**



## SEGURANÇA ALIMENTAR *VERSUS* INSEGURANÇA DO CONSUMIDOR

*Oliveira, B., Casal, S.*

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto  
Tel +351-222078927 Fax +351-222003977 e-mail: [beatoliv@ff.up.pt](mailto:beatoliv@ff.up.pt)

Nesta palestra pretende-se abordar um lado menos mediático da “Segurança Alimentar” e que se relaciona com a ausência de cuidados após produção e com o desequilíbrio nutricional de alguns alimentos. É do conhecimento geral que tem sido feito um esforço imenso por parte da indústria alimentar em produzir alimentos seguros. Nessa política tem tido importância fundamental a implementação do HACCP e a formação dos envolvidos nesses processos industriais e/ou semi-industriais. Sem dúvida que um produto que sai de uma indústria é actualmente mais controlado que à uns anos atrás. Mas o que acontece a esse produto ultrapassada a fronteira da indústria produtora? Será que continuam os cuidados para o manter em condições adequadas e, portanto seguro? Como é que o consumidor, em geral, trata os produtos após aquisição?

É objectivo desta palestra exemplificar alguns casos de negligência por parte dos diferentes intervenientes no circuito alimentar, incluindo consumidores, que podem pôr em risco todo o trabalho prévio.

Outra vertente que merece atenção é a que se relaciona com os alimentos fortificados, com alegações de saúde ou modificados no sentido de lhes retirar determinado elemento/nutriente. Estes alimentos serão, efectivamente, nutricionalmente seguros ou podem desencadear situações de má-nutrição (sobrenutrição)? Até que ponto os *media* não desempenham um papel negativo apelando ao consumo de certos produtos, para determinadas faixas etárias? Estará a população em geral preparada para descodificar as mensagens veiculadas pela publicidade?

Todos os pontos referidos serão tratados, embora com a limitação do tempo, com o objectivo de chamar a atenção para a sua importância e alertar a comunidade para esta problemática. O consumidor está preparado para enfrentar todos estes desafios?



# LIPID COMPOSITION AND NUTRITIONAL VALUE OF SOME MEATS WITH PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN (PDO)

*Prates<sup>1,\*</sup>, J.A.M.; Ribeiro<sup>1</sup>, V.; Quaresma<sup>1</sup>, M.; Lourenço<sup>1</sup>, M.; Martins<sup>1</sup>, S.; Alves<sup>2</sup>, S.; Portugal<sup>2</sup>, A.; Castro<sup>3</sup>, M.; Fontes<sup>1</sup>, C.M.G.; Bessa<sup>2</sup>, R.J.B.; and Alfaia<sup>1</sup>, C.M.*

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - CIISA, Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Estação Zootécnica Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia - Centro de Estudos Farmacêuticos, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

\* tel. 213652890, fax. 213652895, japrates@fmv.utl.pt.

**Palavras-chave:** meat-PDO; fatty acids; CLA isomers; total lipids, cholesterol.

**Resumo:** The aim of this work was to characterise and compare the lipid composition (lipid and cholesterol contents, fatty acid composition and conjugated linoleic acid isomers) and nutritional value (PUFA/SFA and n-6/n-3 ratios) of four Portuguese meats with Protected Designation of Origin (PDO; Carnalentejana-PDO beef, Mertolenga-PDO beef, Barrosã-PDO veal and Arouquesa-PDO veal), in two distinct slaughter seasons (early autumn and late spring). The purebred bovines were maintained according to the traditional production systems following the rules established in the meat-PDO product specifications. In addition, we also compared the nutritional quality of intramuscular fat in these meats-PDO with the meat obtained from Alentejana×Charolais crossbred young bulls produced in a typical intensive concentrate-based system. The results obtained for Carnalentejana-PDO beef (Meat Science, 2006, 72, 425-436), Mertolenga-PDO beef (Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86, 2196-2205), Barrosã-PDO veal (Food Chemistry, 2006, 94, 469-477; Meat Science, 2007, 75, 44-52) and Arouquesa-PDO veal (Meat Science, submitted), indicate that intramuscular fats of meats-PDO, as a result of the beneficial grass effects on the characteristics of meat lipids, are of greater nutritional quality than intensively produced beef from crossbred young bulls throughout the year. However, the data suggest that beef-PDO (Carnalentejana-PDO and Mertolenga-PDO) intramuscular fat, relative to that from veal-PDO (Barrosã-PDO veal and Arouquesa-PDO veal), depicts a low nutritional quality throughout the year. These differences may be explained by the finishing period of Alentejana and Mertolenga purebred young bulls on concentrate, which attenuates the beneficial effects on the characteristics of meat fat associated with grass intake.

## 1. INTRODUCTION

Fatty acid composition and cholesterol levels in meat have received an increased attention in view of their implications for human health and product quality [1]. The ratios of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids (PUFA/SFA) and n-6/n-3 PUFA are widely used to evaluate the nutritional value of fat. Low ratios of PUFA/SFA and high levels of cholesterol in typical Western diets have been considered as major risk factors of

cardiovascular diseases, which are among the most important causes of human mortality in developed countries. Moreover, typical Western diets display a very high n-6/n-3 ratio (15-17/1), which not only favours the development of cardiovascular diseases, but also cancer, inflammatory and autoimmune diseases. In addition, fats presenting low PUFA/SFA ratio are considered unfavourable, because they may induce an increase in cholesterolaemia. It is well established that lower PUFA/SFA and higher n-6/n-3 ratios of most meats are a major cause of the imbalance in the fatty acid intake of today's consumers. Finally, meat also provides from one third to one half of the maximum daily-recommended intake of cholesterol (300 mg).

Conjugated linoleic acids (CLA) is a generic term used to describe the positional and geometric isomers of linoleic acid (18:2n-6) in which the double bonds are conjugated. The major CLA isomer, *cis*-9,*trans*-11 18:2 (18:2c9,t11), is produced in the rumen during the microbial biohydrogenation of dietary 18:2n-6 and in the tissues (endogenously) through  $\Delta^9$  desaturation of 18:1t11 [2]. It is now accepted that the major contribution to 18:2c9,t11 present in milk and in ruminant meats is the endogenous synthesis. Twenty different CLA isomers have been reported as occurring naturally in food, especially in ruminant fat. In animal models, some CLA isomers exhibit anticarcinogenic, antithrombotic, antiatherogenic and immune modulator properties. Specific physiological effects have been linked with individual CLA isomers. The t10,c12 isomer may play an important role in lipid metabolism, while the c9,t11 and the t10,c12 isomers seem to be equally effective in anticarcinogenesis and antiatherogenesis. Since individual CLA isomers have different biological activities, the determination of the CLA isomeric profiles in meat is required.

Fatty acid composition of beef is influenced by dietary factors and, to a lesser extent, by non-dietary environmental and genetic factors [3]. Dietary factors are often linked with a particular production system. Meat from grazing ruminants is expected to reflect the variability of pasture biomass. In fact, the nutritive value of pasture is highly dependent on cultural practices, season and geographical factors. In addition, breed differences in fatty acid composition in several farm animal species have also been reported. Meats with Protected Designation of Origin (PDO), derived from local production systems and animal breeds, are certified by European Union legislation and are expected to present unique quality and organoleptic characteristics, especially associated with specific properties of its lipid fraction (Council Regulation n°2081/92 of 14/7, EEC).

In spite of being four important commercial Portuguese meats-PDO, there are no detailed reports on the composition of the Carnalentejana-PDO beef, Mertolenga-PDO beef, Barrosã-PDO veal and Arouquesa-PDO veal. Therefore, the goal of this work was to characterise the lipid composition and nutritional value of these meats-PDO in two distinct and more important slaughter seasons (early autumn and late spring).

## 2. MATERIALS AND METHODS

The purebred bovines (Alentejana, Mertolenga, Barrosã and Arouquesa) were maintained according to the traditional production systems following the rules established in the meats-PDO product specifications. The Alentejana and Mertolenga young bulls, and the Barrosã and Arouquesa calves, were slaughtered in October 2002 (early autumn sampling) or June 2003 (late spring sampling). Meat samples were taken from the ribeye portion (T1-T3) of *longissimus dorsi* (LD) and distal region of *semitendinosus* (ST) muscles of young bulls. Comparing with ST muscle, LD muscle is relatively red and differently involved in the physical activity imposed by grazing. All meat samples were collected 2-3 days after

slaughter (+1 °C), ground using a food processor (3 × 5 s), vacuum packed and stored at -80 °C until required for analysis.

Meat samples were lyophilised (-60 °C and 2.0 hPa) until constant weight using a lyophilisator Edwards Modulyo (Edwards High Vacuum International, UK), maintained exsiccated at room temperature, and analysed within two weeks. Lyophilised meat samples were weighed (approximately 250 mg), in triplicate (two tubes for total lipid determination and the other tube for both FAME and CLA methyl ester profiles), into screw teflon-lined cap tubes. Intramuscular fat was extracted as described by Alfaia *et al.* [4].

Gas chromatography analyses of FAME were performed with an Agilent 6890 Series II gas chromatograph (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) fitted with a flame ionization detector (FID). The FAME were separated, on a SP<sup>TM</sup>-2560 fused-silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA), identified and quantified as described by Alfaia *et al.* [4].

The methyl esters of CLA isomers were individually separated by triple silver-ion columns in series (ChromSpher 5 Lipids, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Chrompack, Bridgewater, NJ, USA), using an high performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with autosampler and diode array detector (DAD) adjusted to 233 nm. The separation conditions, as well as the identification and quantification of CLA isomers were described previously [4].

Total cholesterol was extracted from lyophilised meat, after direct saponification with saturated methanolic KOH solution, according to the procedure of Prates *et al.* [6]. Cholesterol was analysed by normal-phase HPLC (column Zorbax Rx-Sil, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), using an HPLC system (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with autosampler and DAD set at 206 nm, as described in Prates *et al.* [6].

The data were analysed using the MIXED procedure of SAS, considering the animal within slaughter season group as subject and the muscle type as repeated measures. The model considers as fixed effects the slaughter season (meat-PDO from early autumn and that from late spring), the muscle type (LD and ST) and the interaction between animal group and muscle type.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 depicts the results concerning the total lipids, total cholesterol, CLA isomers and nutritional ratios of fatty acids in LD and ST muscles of intensively produced beef and meats-PDO from early autumn and late spring. Detailed information on the nutritional value of intensively produced beef and Carnalentejana-PDO beef was published in Meat Science (2006, 72, 425-436) [4], Mertolenga-PDO beef in Journal of the Science of Food and Agriculture (2006, 86, 2196-2205) [5], Barrosã-PDO veal in Food Chemistry (2006, 94, 469-477) [6] and Meat Science (2007, 75, 44-52) [7] and Arouquesa-PDO veal submitted to Meat Science [8]. The ratios of n-6/n-3 and PUFA/SFA (as defined in Table 1) are nutritional indexes widely used to evaluate the nutritional value of fat for human diet. Current nutritional recommendations are that the PUFA/SFA ratio in human diet should be above 0.45 and, within the PUFA, the n-6/n-3 ratio should not exceed 4.0 (British Department of Health, 1994).

Meat from Alentejana Portuguese purebred young bulls raised according to Carnalentejana-PDO specifications showed no important seasonal differences in the levels of

fatty acids, CLA isomers and total cholesterol. In contrast, there were some different intramuscular fat characteristics when beef-PDO was compared with meat from Alentejana×Charolais crossbred young bulls fed intensively with concentrate. This observation might reflect the semi-extensive production system used for raising the Alentejana purebred animals. However, the findings suggest that the finishing period of Alentejana purebred young bulls on concentrate attenuates most of the typical effects on the characteristics of meat fat associated with grass intake. Nevertheless, from a nutritional point of view, Carnalentejana-PDO beef seems to be more healthful than meat obtained from the conventional intensively-fed young bulls because of its lower n-6/n-3 ratio, although this ratio is always above the recommended values for human diet, and higher proportions of c9,t11 CLA isomers. Taken together, the data indicate that Carnalentejana-PDO beef is of greater nutritional quality than intensively produced beef from crossbred young bulls throughout the year.

Mertolenga-PDO beef showed seasonal differences in the levels of several fatty acids, some CLA isomers and total cholesterol. The data indicate that beef-PDO has intermediate values (between meat from grain- and pasture-fed cattle) in the content of several fatty acids, total lipids, n-6/n-3 ratio, total CLA and some CLA isomers. These data may be explained by the semi-extensive production system of Mertolenga young bulls. However, beef from June, relative to that from October, seems to have a less attenuated grass effect, possibly due to the shortest finishing period of young bulls on concentrate feeds. From a nutritional point of view, meat-PDO from June seems to be more healthful than that from October because of its lower n-6/n-3 ratio, although this ratio is always above the recommended values for the human diet. Overall, the data indicate that, although the finishing period of Mertolenga young bulls with cereal-rich concentrate attenuates most of the beneficial grass effects on the characteristics of meat fat throughout the year, beef-PDO from late spring is of greater nutritional quality than that from early autumn.

Barrosã-PDO veal only showed seasonal differences in the levels of some minor fatty acids and CLA isomers, as well as in the PUFA/SFA ratio. The data indicate that Barrosã-PDO veal has values of pasture-fed cattle, in both slaughter seasons, concerning the content of several fatty acids, some partial sums of fatty acids, n-6/n-3 ratio, total and specific CLA contents, and some individual CLA isomers (grass intake indicators). This observation might reflect similar final effects of the different suckling and grazing periods between autumn-slaughtered and spring-slaughtered calves. From a human nutrition point of view, veal-PDO originated in both slaughter seasons presents health related parameters because the CLA contents and the percentages of c9,t11 isomer are relatively high, and the n-6/n-3 ratios are inside the recommended values for the human diet. Overall, the data indicate that Barrosã-PDO veal intramuscular fat, as a result of the beneficial grass effects on the characteristics of meat lipids, depicts a high nutritional quality throughout the year.

Arouquesa-PDO veal only showed seasonal differences in the levels of some minor fatty acids and CLA isomers. The data indicate that Arouquesa-PDO has values of pasture-fed cattle, in both slaughter seasons, concerning the content of several fatty acids, some partial sums of fatty acids, n-6/n-3 ratio, total and specific CLA contents, and some individual CLA isomers (grass intake indicators). This observation might reflect similar final effects of the different suckling and grazing periods between autumn-slaughtered and spring-slaughtered calves. From a human nutrition point of view, veal-PDO originated in both slaughter seasons presents good health related parameters because the CLA contents and the percentages of c9,t11 CLA isomer are relatively high, and the n-6/n-3 ratios are inside the recommended values for the human diet. Overall, the data indicate that Arouquesa-PDO veal intramuscular fat, as a result of the beneficial grass effects, depicts a high nutritional quality throughout the



year.

#### 4. CONCLUSIONS

In conclusion, the data indicate that intramuscular fat of meats-PDO, as a result of the beneficial grass effects on the characteristics of meat lipids, is of greater nutritional quality than that of intensively produced beef from crossbred young bulls throughout the year. However, the results suggest that beef-PDO (Carnalentejana-PDO and Mertolenga-PDO) intramuscular fat, relative to that from veal-PDO (Barrosã-PDO veal and Arouquesa-PDO veal), depicts a low nutritional quality throughout the year. This difference may be explained by the finishing period of Alentejana and Mertolenga purebred young bulls on concentrate, which attenuates most of the typical effects on the characteristics of meat fat associated with grass intake. These differences clearly result from the benefits of grass-fed on ruminant meat, which should be brought to the attention of the public, nutritionists, the medical profession, producers and consumers.

#### Acknowledgements

Sampling assistance (Dr. Luís Bagulho Silva, Carnalentejana S.A.; Dr. Paulo Valente, Sapju Lda.; Eng. Roberto Santos, Montado Alentejano e Tradição SA; Dr. João Paulo Costa, CAPOLIB; Eng. Manuel Cirnes, ANCRA), doctorate fellowship (SFRH/BD/2005/22566) and financial support (grants AGRO/2003/512, POCTI/CVT/2002/44750 and CIISA/2002/52) are acknowledged.

#### References

- [1] - JD Wood, RI Richardson, GR Nute, AV Fisher, MM Campo, PR Kasapidou, M Enser - *Meat Sci.* **66** (2004) 21.
- [2] - JM Griinari, DE Bauman - *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1., AOCS Press, Champaign, IL, (1999).
- [3] - S De Smet, K Raes, D Demeyer - *Anim Res.* **53** (2004) 81.
- [4] - C Alfaia, V Ribeiro, M Lourenço, M Quaresma, S Martins, A Portugal, C Fontes, R Bessa, M Castro, J Prates - *Meat Sci.* **72** (2006) 425.
- [5] - C Alfaia, M Quaresma, M Castro, S Martins, A Portugal, C Fontes, R Bessa, J Prates - *J. Sci. Food Agr.* **86** (2006) 2196.
- [6] - J Prates, M Quaresma, R Bessa, C Fontes, C Alfaia - *Food Chem.* **94** (2006) 469.
- [7] - C Alfaia, M Castro, S Martins, A Portugal, S Alves, C Fontes, R Bessa, J Prates - *Meat Sci.* **75** (2007) 44.
- [8] - C Alfaia, M Castro, S Martins, A Portugal, S Alves, C Fontes, R Bessa, J Prates - Submitted to *Meat Sci.*

**Table 1.** Total lipids (mg/g), total cholesterol (mg/g), total (mg/g) and specific (mg/g fat) contents of CLA isomers, and nutritional ratios of fatty acids in *longissimus dorsi* (LD) and *semitendinosus* (ST) muscles of intensively produced beef and meats-PDO from early autumn and late spring. Extracted from the detailed information on the lipid composition and nutritional value reported by our group for meats-PDO [ref. 4,5,6,7,8].

|   | Autumn             |                    | Spring             |                    | SEM   | Significance levels |        |     |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|---------------------|--------|-----|
|   | LD                 | ST                 | LD                 | ST                 |       | Season              | Muscle | SxM |
| <b>Intensively produced beef (n=15)</b> |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total lipids                            | 15.2               | 8.61               | -                  | -                  | 1.351 | -                   | ***    | -   |
| Total cholesterol                       | 0.37               | 0.35               | -                  | -                  | 0.010 | -                   | ns     | -   |
| <i>CLA</i>                              |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total                                   | 0.064              | 0.024              | -                  | -                  | 0.010 | -                   | ***    | -   |
| Specific                                | 4.45               | 3.88               | -                  | -                  | 0.563 | -                   | ns     | -   |
| Ratios of FA                            |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| n-6/n-3                                 | 20.2               | 16.7               | -                  | -                  | 1.322 | -                   | **     | -   |
| PUFA/SFA                                | 0.40               | 0.84               | -                  | -                  | 0.070 | -                   | ***    | -   |
| <b>Carnalentejana-PDO beef (n=30)</b>   |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total lipids                            | 21.9               | 13.1               | 14.8               | 11.2               | 1.351 | **                  | ***    | ns  |
| Total cholesterol                       | 0.48               | 0.42               | 0.49               | 0.43               | 0.010 | ns                  | ***    | ns  |
| <i>CLA</i>                              |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total                                   | 0.100              | 0.042              | 0.066              | 0.054              | 0.010 | ns                  | ***    | ns  |
| Specific                                | 5.07               | 3.82               | 4.92               | 5.06               | 0.563 | ns                  | ns     | ns  |
| Ratios of FA                            |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| n-6/n-3                                 | 11.4               | 10.0               | 13.7               | 11.5               | 1.322 | ns                  | **     | ns  |
| PUFA/SFA                                | 0.32 <sup>a</sup>  | 0.63 <sup>b</sup>  | 0.42 <sup>a</sup>  | 0.56 <sup>b</sup>  | 0.070 | ns                  | ***    | *   |
| <b>Mertolenga-PDO beef (n=30)</b>       |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total lipids                            | 17.4               | 12.0               | 18.0               | 11.8               | 0.934 | ns                  | ***    | ns  |
| Total cholesterol                       | 0.44               | 0.40               | 0.50               | 0.44               | 0.011 | ***                 | ***    | ns  |
| <i>CLA</i>                              |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total                                   | 0.062              | 0.039              | 0.066              | 0.031              | 0.006 | ns                  | ***    | ns  |
| Specific                                | 3.65               | 3.39               | 3.51               | 2.63               | 0.350 | ns                  | ns     | ns  |
| Ratios of FA                            |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| n-6/n-3                                 | 14.9               | 13.6               | 7.11               | 6.87               | 1.012 | ***                 | *      | ns  |
| PUFA/SFA                                | 0.41               | 0.61               | 0.36               | 0.68               | 0.047 | ns                  | ***    | ns  |
| <b>Barrosã-PDO veal (n=27)</b>          |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total lipids                            | 23.2 <sup>a</sup>  | 19.6 <sup>b</sup>  | 22.9 <sup>a</sup>  | 15.6 <sup>c</sup>  | 1.136 | ns                  | ***    | *   |
| Total cholesterol                       | 0.56               | 0.50               | 0.45               | 0.42               | 0.010 | ***                 | *      | ns  |
| <i>CLA</i>                              |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total                                   | 0.199              | 0.148              | 0.172              | 0.111              | 0.022 | ns                  | ***    | ns  |
| Specific                                | 8.52               | 7.59               | 7.42               | 7.01               | 0.795 | ns                  | ns     | ns  |
| Ratios of FA                            |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| n-6/n-3                                 | 3.10               | 2.99               | 3.05               | 2.92               | 0.232 | ns                  | ns     | ns  |
| PUFA/SFA                                | 0.25               | 0.29               | 0.19               | 0.24               | 0.023 | *                   | *      | ns  |
| <b>Arouquesa-PDO veal (n=31)</b>        |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total lipids                            | 26.8 <sup>a</sup>  | 24.6 <sup>a</sup>  | 30.3 <sup>a</sup>  | 16.9 <sup>b</sup>  | 2.563 | ns                  | **     | *   |
| Total cholesterol                       | 0.53               | 0.52               | 0.52               | 0.49               | 0.010 | ns                  | ns     | ns  |
| <i>CLA</i>                              |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| Total                                   | 0.208 <sup>a</sup> | 0.222 <sup>a</sup> | 0.257 <sup>a</sup> | 0.117 <sup>b</sup> | 0.026 | ns                  | **     | **  |
| Specific                                | 8.85               | 8.86               | 8.74               | 6.82               | 0.623 | ns                  | ns     | ns  |
| Ratios of FA                            |                    |                    |                    |                    |       |                     |        |     |
| n-6/n-3                                 | 2.28               | 2.19               | 1.95               | 1.99               | 0.157 | ns                  | ns     | ns  |
| PUFA/SFA                                | 0.21 <sup>a</sup>  | 0.21 <sup>a</sup>  | 0.17 <sup>a</sup>  | 0.29 <sup>b</sup>  | 0.017 | ns                  | ***    | *** |

Significance: ns, P>0.05; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001; means in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05); SEM, standard error of mean. SxM means interaction between slaughter season (S) and muscle type (M).

n-6/n-3 = n-6/n-3 ratio [(sum of 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6 and 22:4n-6)/(sum of 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3)].

PUFA/SFA = polyunsaturated/saturated ratio [(sum of 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3)/(sum of 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0 and 20:0)].

# EFEITO DO SEXO E DO PADRÃO DE CRESCIMENTO NA QUANTIDADE E NAS CARACTERÍSTICAS DO COLAGÉNIO INTRAMUSCULAR DE BOVINOS

Almeida, M.<sup>(1)</sup>; Monteiro, A.C.G.<sup>(1)</sup>; Lemos, J.P.C.<sup>(1)</sup>; Simões, J.A.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> CIISA – Faculdade de Medicina Veterinária, Av. Universidade Técnica, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa

<sup>(2)</sup> Estação Zootécnica Nacional (INIAP), Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

## Resumo

Está bem determinado que a tenrura da carne de bovino é a característica organoléptica mais valorizada pelos consumidores. A tenrura da carne de bovino é afectada, entre outros factores, pela actividade proteolítica das calpaínas e pela quantidade e características do colagénio intramuscular. Enquanto que os efeitos da raça e do padrão de crescimentos na tenrura da carne estão bem documentados, os efeitos do sexo e, principalmente, da interacção sexo x padrão de crescimento permanecem por esclarecer.

Assim, definiram-se como objectivos dum projecto de investigação (PIDDAC 801/04) a avaliação dos efeitos do sexo e do padrão de crescimento na actividade das calpaínas e na quantidade e características do colagénio intramuscular e, conseqüentemente, na tenrura da carne de bovino. No presente trabalho apresentam-se resultados preliminares, referentes apenas ao estudo daqueles efeitos na quantidade e características do colagénio intramuscular.

Utilizaram-se 40 bovinos de raça Alentejana, 20 machos inteiros e 20 fêmeas, que foram submetidos a dois regimes alimentares após o desmame: ad libitum e restricto (regime de manutenção durante 6 meses, seguido de ad libitum até ao abate), num delineamento de blocos casualizados (as idades no início do ensaio), num total de 4 tratamentos: os machos dos grupos ad libitum e restricto foram abatidos aos 18 e aos 24 meses de idade, respectivamente, enquanto que as fêmeas dos dois grupos foram abatidas aos 16 e aos 18 meses idade, respectivamente. Após os 7 dias de maturação foram colhidas amostras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Biceps femoris*.

No músculo *Biceps femoris* nem a quantidade nem a solubilidade do colagénio foram afectadas pelos factores em estudo. No *Longissimus dorsi* a quantidade de colagénio não foi afectada nem pelo sexo nem pelo padrão de crescimento, enquanto que a interacção significativa sexo x padrão de crescimento indica que a restrição alimentar seguida dum período de realimentação aumenta a solubilidade apenas nas fêmeas.



# OCCURRENCE OF FUMONISINS B<sub>1</sub> AND B<sub>2</sub> AND OCHRATOXIN A IN *BROA*

*Silva<sup>1</sup>, L.J.G.; Juan<sup>2</sup>, C.; Lino<sup>\*1</sup>, C.M.; Pena<sup>1</sup>, A.; Mañes<sup>2</sup>, J.*

<sup>1</sup>Group of Bromatology, CEF, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal <sup>2</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain  
[cmlino@ci.uc.pt](mailto:cmlino@ci.uc.pt)

**Keywords:** fumonisin B<sub>1</sub>, fumonisinB<sub>2</sub>, ochratoxin A, broa

**Abstract:** Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) and ochratoxin A (OTA) contamination in broa samples were evaluated in 30 samples purchased from bakeries, confectionery's shops and supermarkets located in the city of Coimbra.

Fumonisin (FBs) were extracted with methanol:water (80:20), cleaned-up with immunoaffinity columns (IAC), and derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA). OTA was extracted with PBS: methanol (50:50, v:v), and cleaned-up by IAC. Both were detected and quantified by liquid chromatography with spectrofluorimetric detection (LC-FD).

For FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> the detection limit was 20 µg kg<sup>-1</sup> and 15 µg kg<sup>-1</sup>, respectively. Recoveries were higher than 75% for all fortification levels and the RSDs were lower than 15.2%. For OTA, the limit of quantification was 0.03 µg kg<sup>-1</sup>. Recoveries were higher than 99% and the RSDs were lower than 9.3%.

FBs were found in 25 samples at concentrations ranging from 142 to 550 µg kg<sup>-1</sup>. The limit proposed by European regulations was overlapped by 26.7% of the samples. OTA was found in 21 samples ranging from 0.03 to 5.86 µg kg<sup>-1</sup>. One sample exceeded the maximum limit established.

OTA intake was distant from the estimated total intake in the European diet. The estimated daily intake for FB<sub>1</sub>, and FB<sub>2</sub> was lower than 2 µg kg<sup>-1</sup> b.w./day established by European Commission.

## 1. INTRODUCTION

Broa is one traditional type of bread very appreciated and mainly consumed in the northern and central zones of Portugal. It is mainly produced with maize, a cereal where the fumonigenic (*Fusarium*) and ochratoxigenic (*Aspergillus* and *Penicillium*) mould grows, producing fumonisins (FBs), mostly fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) and fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), and ochratoxin A (OTA) [1], respectively.

Exposure to FBs and OTA is worldwide [2,3]. They bear potential toxicity, leading to acute and chronic effects in humans such as immune toxicity, and carcinogenicity [4]. FBs, due to its resemblance with sphingoid bases, produce a wide range of biological effects including leucoencephalomalacia in horses, pulmonary oedema in pigs, and nephrotoxicity and liver cancer in rats. In humans, the risk of oesophageal cancer, in the Transkei region of South Africa and China, and the possibility of being connected with neural tube defects in South Texas, USA have been reported [2, 5-8]. OTA has teratogenic, hepatotoxic, carcinogenic and nephrotoxic activity in many animal species, including human beings [9]. In several areas of Eastern Europe, where chronic exposure to OTA occurs, this mycotoxin is suspected of being related to the cancer aetiology of the urinary system, and in kidney pathologies typical of Balkan endemic nephropathy (BEN) [3]. IARC has classified FBs and OTA as Group 2B, possible human carcinogens [10,11].

Few studies about OTA and FBs contamination levels in bread samples are available. Moreover, the risk assessment for humans potentially exposed to multi-mycotoxins suffers very much from the lack of exposure data [4].

The present study, carried out in the central zone of Portugal, aims to evaluate FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> and OTA contamination in broa samples, using liquid chromatography with spectrofluorimetric detection (LC-FD). Considering the high consumption of maize bread in Portugal and the susceptibility of its contamination with FBs and OTA, its evaluation is of most importance.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Apparatus

For LC-FD analysis, a high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus consisted of a pump model 307 Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), one 50  $\mu\text{L}$  injector Rheodyne, model 7125 (Cotati, CA, USA), a guard column, C18 – 5  $\mu\text{m}$  Nucleosil 120 KS (30 mm x 4 mm i. d.), and a column, C18 – 5  $\mu\text{m}$  Nucleosil 120 (250 mm x 4.6 mm i. d.) was used. A Perkin Elmer spectrofluorimeter, model LS45 (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) was also used. The results were recorded on a 3390 integrator (Hewlett-Packard, Philadelphia, PA).

### 2.2. Chemicals

FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> and OTA standards were commercially obtained from Sigma Chemicals Co (St. Louis, USA). HPLC grade solvents and analytical grade reagents were used for all purposes. Boron trifluoride-methanol (14%), and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) were obtained from Sigma Chemicals Co (St. Louis, USA). FumoniTest<sup>TM</sup> and Ochratest<sup>TM</sup> immunoaffinity columns (IAC) were from Vicam (Watertown, USA).

FBs stock solutions were prepared at 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> vials with 1 mL acetonitrile:water (50:50, v:v), and intermediate solutions were prepared at 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . OTA stock solution, prepared in the OTA vial, was made in 4 mL toluene:acetic acid (99:1, v:v) at 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , intermediate standard solution was prepared at 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

For fortification assays with FBs, one work solution was prepared with acetonitrile:water (50:50, v:v) at 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for both fumonisins. For OTA, a standard solution was prepared in toluene:acetic acid (99:1, v:v) at 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and a work solution with mobile phase at 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . For FBs calibration curve, two work solutions were prepared at 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The others were prepared by diluting these at different concentrations. For OTA calibration curve, the standard solution was at 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and suitable dilutions were done. FBs solutions were kept in amber flasks.

### 2.3. Sampling

Thirty samples were purchased in commercially available size during September 2005 from bakeries, confectionery's shops and supermarkets located in the city of Coimbra and its countryside, central zone of Portugal.

### 2.4. Recoveries

FBs recoveries were determined by spiking a blank sample with known amounts of fumonisins at final concentrations of 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for FB<sub>1</sub> and 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for FB<sub>2</sub>. For OTA recovery studies, final fortification levels of 0.25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 2.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , were used. After addition, FBs and OTA were allowed to stand for 15 min at room temperature before extraction.

### 2.5. Determination

FBs extraction, clean-up, and LC-FD detection and quantification were done according to Lino et al. [6].

For OTA, the sample (20 g) was extracted with 100 mL PBS:methanol (50:50, v/v), homogenized for 5 min, following filtration of the mixture. After, 20 mL have been diluted with 30 mL of PBS, this solution was passed through an OchraTest<sup>TM</sup> column for clean-up using a vacuum manifold. The column was washed with 10 mL of water before eluting OTA

with 3 mL of methanol. Methanol was dried at  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  with  $\text{N}_2$ , and the residue was reconstituted in 250  $\mu\text{L}$  of mobile phase and injected into the HPLC system. OTA was determined by LC-FD using an excitation and emission wavelengths of 333 and 460 nm, respectively. The mobile phase (acetonitrile:water:acetic acid: 49.5:49.5:1.0, v/v/v) was maintained at a flow rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The HPLC method showed good linearity between 0.5 ng and 10.4 ng for  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$ , with  $r^2$  values of 0.984 and 0.994, respectively. OTA linearity was good as well as shown by the fact that  $r^2$  are above 0.9990.

For  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$  the detection limit was 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for  $\text{FB}_1$  and 15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for  $\text{FB}_2$ . Recoveries were higher than 75% for all fortification levels and the RSDs were lower than 15.2%. For OTA, the limit of quantification was 0.03  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Recoveries were higher than 99% and the RSDs were lower than 9.3% (Table 1).

**Table 1** - Accuracy and intra-assay validation results (n=3) and inter-assay (n=9) with the optimised method

| Mycotoxins    | Fortification level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Recovery mean (%) | RSD (%) | within-day | RSD between-day (%) |
|---------------|---|-------------------|---------|------------|---------------------|
| $\text{FB}_1$ | 250   | 99.7              | 6.5     |            | 7.5                 |
| $\text{FB}_2$ | 200   | 75.0              | 8.6     |            | 15.2                |
| OTA           | 2.5   | 99.6              | 2.7     |            | 9.3                 |

FBs were found in 25 samples (83%) at concentrations ranging from 142 to 550  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Table 2). The limit proposed by European regulations was overlapped by 8 (26.7%) samples. Figure 1 shows a chromatogram of a standard solution at 2.08 ng of  $\text{FB}_1$  and  $\text{FB}_2$ , and a chromatogram of a contaminated sample with 136.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of  $\text{FB}_1$  and 82.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of  $\text{FB}_2$ .

The obtained values suggest that the FBs content in flour maize, the main ingredient of broa, was very high, what is confirmed by a previous investigation [6]. The comparison between countries in Europe is somehow difficult regarding the few reports of contamination by fumonisins in this kind of goods.

**Table 2** – Incidence and levels of FBs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and OTA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in broa

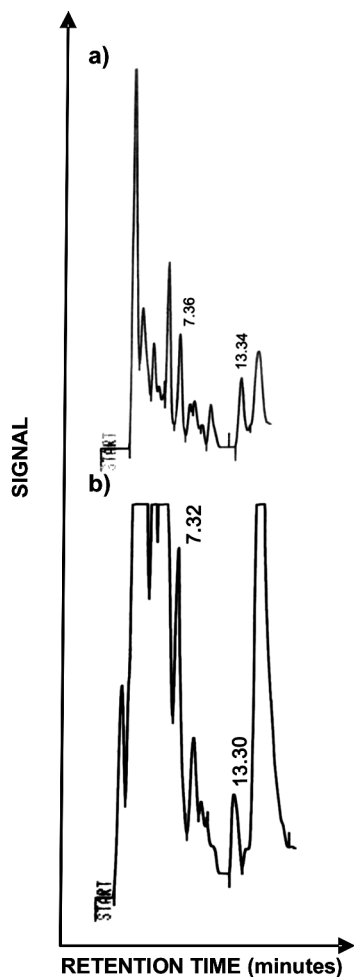
| Mycotoxins    | No (%) of positive samples | Range     | Mean $\pm$ SD   | Median |
|---------------|----------------------------|-----------|-----------------|--------|
| $\text{FB}_1$ | 24 (80)                    | nd – 448  | 197 $\pm$ 130   | 205    |
| $\text{FB}_2$ | 25 (83)                    | nd – 207  | 77 $\pm$ 60     | 70     |
| FBs           | 25 (83)                    | nd – 550  | 274 $\pm$ 267   | 266    |
| OTA           | 21 (70)                    | nd – 5.86 | 0.44 $\pm$ 1.20 | 0.09   |

Comparison between Portuguese and Italian surveillance shows that in what respects to  $\text{FB}_1$  the levels found in broa are higher than those found in Italian bread, however the contamination of  $\text{FB}_2$  of broa is lower relatively to Italian results [12].

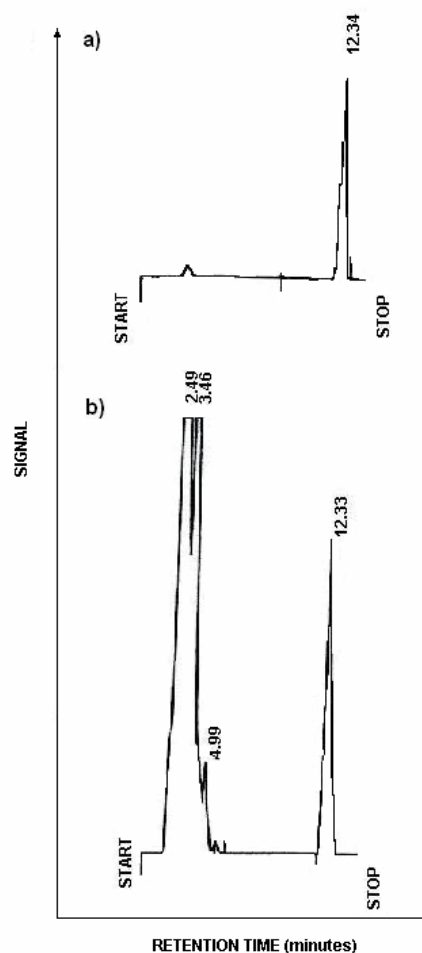
OTA was found in 21 samples (70%) ranging from 0.03 to 5.86  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Table 2). One exceeded the maximum level of OTA in cereal products established by the EU Commission Regulation, 3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , and two were near this limit. Figure 2 shows a chromatogram of a standard solution at 0.1 ng of OTA, and a chromatogram of a contaminated sample with 2.65  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of OTA.

Few studies about OTA levels in bread samples are available. Osnaya et al. [13] found two contaminated samples in twenty bread samples analyzed in Spain with OTA levels of 2.55 and 1.82  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

The estimated daily intake for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> was lower than the tolerable daily intake, 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  b.w./day, established by European Commission [14]. The OTA intake was distant from the estimated total intake of OTA in the European diet [15].



**Figure 1** – a) Chromatogram of a standard solution at 2.08 ng of FB<sub>1</sub> (RT=7.36) and FB<sub>2</sub> (RT=13.34); b) chromatogram of a contaminated sample with 136.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of FB<sub>1</sub> and 82.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of FB<sub>2</sub>.



**Figure 2** – a) Chromatogram of a standard solution at 0.1 ng of OTA (RT=12.33); b) chromatogram of a contaminated sample with 2.65  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of OTA.

#### 4. CONCLUSIONS

The methods used for the determination of FBs and OTA in broa provided good results in terms of accuracy, repeatability, intermediate precision and sensitivity. Eighty three per cent of the samples were contaminated with FBs, and 70% with OTA. For both groups of mycotoxins, maximum limits established by European regulations were overlapped, suggesting the need of a systematic control. However, none of the analyzed samples exceeded the tolerable daily intake.



## **Acknowledgments**

This work was carried out with the financial support, which is gratefully acknowledged, from the FCT and FEDER/ POCTI and CRUP (Integrated Action programme between Portugal and Spain, E-1/05 and HP04-69). The authors are also gratefully recognized to FCT for a PhD fellowship granted to Liliana J. G. Silva, and the Spanish Ministry of Education and Science for a research grant (BI4-40) to C. Juan.

## **References**

- [1] - Scudamore KA, Patel S (2000) Food Additives and Contaminants 17, 407-416.
- [2] - Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Sydenham EW (1996) Journal of AOAC International 79, 671-686.
- [3] - Pena A, Seirtová M, Lino C, Silveira I, Solich P (2006) Food and Chemical Toxicology, 44, 1449-1454.
- [4] - Creppy EE, Chiarappa P, Baudrimont I, Borracci P, Moukha S, Carratú MR (2004) Toxicology, 201, 115-123.
- [5] - Lino CM, Silva LJG, Pena AS (2004) Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 99, 181-192.
- [6] - Lino CM, Silva LJG, Pena AS, Silveira MI (2006) Analytical and Bioanalytical Chemistry 384, 1214-1220.
- [7] - Lerda D, Bistoni MB, Peralta N, Ychari S, Vasquez M, Bosio G. (2005) Food Chemical Toxicology 43, 691-698.
- [8] - Stack ME (1998) Journal of AOAC International 81, 737-740.
- [9] - Hohler D (1998) Z. Ernährungswiss 37, 2-12.
- [10] - IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Geneve, 56: 489.
- [11] - IARC (International Agency for Research on Cancer) (2002) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, 82:301-366.
- [12] - Cirillo T, Ritieni A, Galvano F, Cocchieri RA (2003) Food Additives and Contaminants 20, 566-571.
- [13] - Osnaya LG, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2006) Journal of Chromatography A 1113, 32-36.
- [14] - Commission Regulation (EC) N°856/2005. Official Journal of European Communities n° L 143, June 7 2005, 0003-0008.
- [15] - Reports on tasks for scientific cooperation (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states (Task 3.2.7). Directorate General Health and Consumer Protection.

## VALOR NUTRICIONAL DE PRODUTOS DE AQUICULTURA

*Gonçalves\*, A.; Cardoso, C. e Bandarra, N.*

Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas - INIAP/IPIMAR  
Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (DITVPP)

\* e-mail: amparo@ipimar.pt

A proporção de pescado para consumo humano proveniente de aquicultura é cada vez maior, com um aumento anual estimado em 10%. No cultivo das espécies de peixe o factor nutrição é amplamente manipulado, através da diversificação na formulação de dietas, mas também na sua administração, com vista à optimização da produção (maior eficácia no crescimento e maior sobrevivência do peixe). A influência da dieta na composição do músculo do peixe é bem conhecida, principalmente no que diz respeito ao perfil em ácidos gordos. Deste modo, considera-se de grande interesse caracterizar o valor nutricional de espécies provenientes de aquicultura, que já entraram na dieta de muitos portugueses, como a dourada e o robalo. O presente trabalho teve como principal objectivo a caracterização nutricional destas espécies e a sua comparação com espécies selvagens, provenientes da frota de pesca.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto UE-QCA III-MARE/FEDER: “Qualidade e Inovação dos Produtos da Pesca”.

# GAMMA IRRADIATION EFFECT ON FATTY ACID COMPOSITION AND CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS OF LAMB MEAT

*Alfaia<sup>1,\*</sup>, C.M.; Ribeiro<sup>1,2</sup>, P.J.L.; Castro<sup>3</sup>, M.; Bessa<sup>2</sup>, R.J.B. and Prates<sup>1</sup>, J.A.M.*

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - CIISA, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Estação Zootécnica Nacional, INIAP, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia - CECF, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

\* Tel. +351-21 360 20 43, Fax. +351-21 365 28 15, cpmateus@fmv.utl.pt.

**Keywords:** lamb meat; gamma irradiation; fatty acids; CLA isomers.

**Abstract:** The perception of quality and “healthiness” of food has become the most important factor for consumer decision. In meat, this aspect is largely related to its fat content and fatty acid composition. Some meat fatty acids play important roles in metabolism and human health. Recent interest in a minor group of fatty acids that are characteristic of ruminant fat, named conjugated linoleic acid (CLA), is also of great nutritional and biological consideration. One of the major concerns with the existing technologies for food preservation, including irradiation, is that these processes may enhance lipid oxidation and thereby affect meat quality<sup>1</sup>. There are attempts to enforce irradiation not only for food safety, but also for technological purposes. Even though irradiation is a prospective technology, its application causes physical-chemical and biochemical changes, that may affect nutritional value and sensory characteristics of irradiated food<sup>2</sup>. The aim of this study was to evaluate the effect of gamma irradiation on fatty acid composition and contents of CLA isomers in frozen lamb meat. The major fatty acids were 18:1c9 as monounsaturated, 16:0 and 18:0 as saturated and 18:2n-6 as polyunsaturated fatty acids. No significant differences were observed in fatty acid composition between non-irradiated and irradiated meat samples. The CLA isomeric distribution showed a clear predominance of the c9,t11-18:2 isomer, in both treatments (78 and 77% of total CLA), followed by the t11,c13-18:2 (10.3 and 10.1%) and t7,c9-18:2 (2.91 and 2.94%). It was found that the irradiation treatment, in contrast to the percentages of partial sums of CLA isomers (*trans,trans*, *cis/trans* and *cis,cis*), which showed significant differences ( $p < 0.001$ ), had no effect on the relative proportions of individual CLA isomers (except for the minor t11,t13-18:2 and t9,t11-18:2). In addition, and regarding the health-promoting CLA isomers (c9,t11-18:2 and t10c12-18:2), the irradiation process does not negatively alter the composition and nutritional value of lamb meat.

## 1. INTRODUCTION

The perception of quality of a food has become the most important factor for consumer decision, and in case of meat, this aspect is largely related to its fat content and fatty acid composition. Some meat fatty acids play important roles in metabolism and human health. Recent interest in a minor group of fatty acids, named conjugated linoleic acid (CLA), is also of great nutritional and biological consideration. The CLA is composed by positional (6,8- to 12,14-) and geometric (*trans,trans*; *trans,cis*; *cis,trans* and *cis,cis*) isomers of linoleic acid (18:2n-6), containing conjugated double bonds, with a multitude of potential health benefits such as anticancerinogenic, anti-obesity, antidiabetogenic, anti-atherogenic and immunomodulation and modulation of bone growth [1]. Twenty different CLA isomers have been reported as occurring naturally in food, especially in ruminant fat [2]. The major CLA isomer, rumenic acid (18:2c9,t11), is produced in the rumen during the microbial biohydrogenation of dietary 18:2n-6 and in the tissues through delta9 desaturation of 18:1t11 [3].

One of the major concerns with the existing technologies for food preservation, including irradiation, is that these processes may enhance lipid oxidation and thereby affect meat quality

[4]. There are attempts to enforce irradiation not only for food safety, but also for technological purposes. The Food and Drug Administration approved irradiation for poultry meat and red meats to control foodborne pathogens and extend product shelf life [5]. In the European Union, the opinions on use of irradiation differ in member countries. Even though irradiation is a prospective technology, its application causes physical-chemical and biochemical changes, that may affect nutritional value and sensory characteristics of irradiated food [6].

Although the wide range of published scientific studies on meat quality [7], there is, as far as we know, no report on the effect of radiation processing on CLA isomeric distribution in meat. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of gamma radiation treatment, at the maximum doses permitted for frozen meat (7 kGy according to FDA), on the fatty acid composition, CLA isomeric profile and content in vacuum-packaged frozen lamb meat.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Twenty Merino Branco lambs were reared on pasture by their dams until weaning at about 90 days of age. After weaning, animals fed *ad libitum* a diet consisting of pelleted lucerne with lipid supplementation and stayed on trial for 6 week. Samples of the *longissimus dorsi* (LD) muscle were collected, minced, vacuum-packaged and stored at -70 °C. Irradiation was conducted at the CHIP - Centro de Higienização por Ionização de Produtos, installed in ITN - Instituto Tecnológico e Nuclear (Sacavém, Portugal), with a <sup>60</sup>Co source at a dose rate of 4.5 kGy/h. The frozen packed samples were gamma-irradiated and received a single dose of 7.0 kGy. Non-irradiated samples were used as controls. Intramuscular fat was extracted from lyophilised meat samples for total lipid determination and for both fatty acids methyl esters (FAME) and CLA methyl esters profiles, using the procedures described previously by Alfaia *et al.* (2006). Gas chromatography analyses of FAME were performed with a GC/FID and FAME were separated (SP<sup>TM</sup>-2560 capillary column, 100 m), identified and quantified as described previously [8]. The methyl esters of CLA isomers were individually separated by triple silver-ion columns in series (ChromSpher 5 Lipids) using an HPLC/DAD. Identification and quantification of CLA isomers were also previously described [8]. The data were analysed using the GLM procedure of SAS.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Total (mg/g muscle) fatty acids and fatty acid composition (weight %), as well as the partial sums (weight %), of the control and irradiated samples from frozen LD muscle of lambs are presented in Table 1. The major fatty acids were oleic acid as MUFA, palmitic and stearic acids as SFA and linoleic acid as PUFA. Similar results were found by other authors in LD muscle of lamb meat [4]. Radiation processing of frozen lamb meat (7 kGy) did not affect ( $p>0.05$ ) the percentage of any of the analysed fatty acids. According to other studies, fewer alterations in PUFA composition occur in meat when irradiation was carried out in frozen state (-20 °C) rather than at 2-5 °C [9]. However, it is well known that, when irradiated, the four major fatty acids present in meat (16:0, 18:0, 18:1 and 18:2n-6) are converted to their corresponding cyclobutanones, in a concentration linearly dependent on the irradiation dose [10]. The unique nature of these radiolytic compounds, which are not detected by our experimental technique, has generated considerable controversy with regard to their toxicity [11]. No significant changes ( $p>0.05$ ) in total fatty acids and in the various partial sums of fatty acids were observed between the irradiated and control samples, reflecting the patterns described above for the individual fatty acids. Also, from Table 1, it can be seen that there were no significant differences ( $p>0.05$ ) for the nutritional indexes, which are widely used to

evaluate the nutritional value of fat for human diet (the n-6/n-3 and PUFA/SFA ratios). Current recommendations are that the PUFA/SFA ratio should be above 0.45 and the n-6/n-3 ratio should not exceed 4.0 [12]. In view of the above guidelines, both ratios are inside the recommended values for the human diet.

Data on the total ( $\mu\text{g/g}$  muscle) and specific ( $\text{mg/g}$  fat) CLA contents and its isomeric distribution (% of total CLA) in non-irradiated and irradiated samples of frozen LD muscle from Merino Branco lambs are displayed in Table 2. Total and specific CLA contents did not show significant differences ( $p>0.05$ ) between irradiated and non-irradiated meats. The CLA isomeric distribution showed a clear predominance of the bioactive c9,t11 isomer in both treatments, followed, in decreasing order, by the t11,c13 and t7,c9 isomers, the last of which co-eluted with minor amounts of the t8,c10 isomer. Meat irradiation (7 kGy) had no significant effects ( $p>0.05$ ) on the percentages of individual CLA isomers, including the two known bioactive isomers (c9,t11 and t10,c12), except for some minor *trans,trans* isomers (t11,t13 and t9,t11). However, the relative proportion of the sum of *trans,trans* isomers is higher ( $p<0.001$ ) in irradiated meat (8.18%), relative to the non-irradiated meat (6.87%), in contrast to the percentages of total *cis/trans* isomers, which was higher ( $p<0.001$ ) in non-irradiated meat (92.8% versus 91.4%). In addition, total *cis,cis* CLA isomers only showed residual percentages of the c9,c11 isomer (0.36-0.37%), with no significant differences ( $p>0.05$ ) between meat samples. These differences in the isomer percentages may be due to the distinct oxidative stability of the geometric groups of CLA isomers. In fact, it was previously showed that the stability of CLA isomers is determined by its *cis* or *trans* configuration but not by the position of their double bonds [13]. According to the same authors, *cis/trans* CLA isomers are relatively more susceptible to autoxidation than *trans,trans* isomers, which was explained by the higher instability and vulnerability to oxygen attack of *cis* double bond relative to *trans* configuration.

Table 1. Total fatty acids ( $\text{mg/g}$  muscle), fatty acid composition (% w/w) and nutritional ratios in non-irradiated and irradiated samples of *longissimus dorsi* muscle from lambs (n=20).

| fatty acids | non irradiated |       | irradiated |       | SEM <sup>a</sup> p <sup>b</sup> |       | fatty acids | non irradiated |       | irradiated |  | SEM <sup>a</sup> p <sup>b</sup> |  |
|-------------|----------------|-------|------------|-------|---------------------------------|-------|-------------|----------------|-------|------------|--|---------------------------------|--|
|             |                |       |            |       |                                 |       |             |                |       |            |  |                                 |  |
| 0:0         | 0.08           | 0.09  | 0.008      | 0.053 | 18:2t9,t12                      | 0.27  | 0.31        | 0.051          | 0.497 |            |  |                                 |  |
| 2:0         | 0.18           | 0.19  | 0.019      | 0.585 | 18:2n-6                         | 11.95 | 11.64       | 0.561          | 0.596 |            |  |                                 |  |
| 4:0         | 2.25           | 2.28  | 0.159      | 0.829 | 18:3n-3                         | 2.63  | 2.66        | 0.369          | 0.704 |            |  |                                 |  |
| 5:0         | 0.32           | 0.34  | 0.029      | 0.599 | 20:2n-6                         | 0.11  | 0.11        | 0.009          | 0.851 |            |  |                                 |  |
| 6:0         | 17.55          | 17.42 | 0.564      | 0.743 | 20:3n-6                         | 0.11  | 0.16        | 0.048          | 0.145 |            |  |                                 |  |
| 7:0         | 0.67           | 0.67  | 0.052      | 0.943 | 20:4n-6                         | 6.67  | 6.53        | 0.564          | 0.667 |            |  |                                 |  |
| 8:0         | 14.78          | 14.85 | 0.236      | 0.677 | 20:5n-3                         | 0.89  | 0.91        | 0.101          | 0.770 |            |  |                                 |  |
| 10:0        | 0.15           | 0.17  | 0.015      | 0.336 | 22:5n-3                         | 1.57  | 1.70        | 0.170          | 0.280 |            |  |                                 |  |
| 4:1         | 0.11           | 0.11  | 0.008      | 0.855 | 22:6n-3                         | 0.48  | 0.52        | 0.048          | 0.392 |            |  |                                 |  |
| 6:1t9       | 0.84           | 0.83  | 0.066      | 0.721 | SFA                             | 35.98 | 36.01       | 0.699          | 0.970 |            |  |                                 |  |
| 6:1c9       | 1.08           | 1.09  | 0.061      | 0.892 | MUFA                            | 31.67 | 32.06       | 0.890          | 0.509 |            |  |                                 |  |
| 7:1c9       | 0.41           | 0.37  | 0.034      | 0.145 | PUFA                            | 24.42 | 24.24       | 1.236          | 0.869 |            |  |                                 |  |
| 8:1t        | 5.43           | 5.06  | 0.618      | 0.372 | total <sup>c</sup>              | 10.68 | 11.38       | 0.812          | 0.419 |            |  |                                 |  |
| 8:1c9       | 28.11          | 28.43 | 0.862      | 0.554 | n-6/n-3                         | 4.06  | 3.78        | 0.425          | 0.095 |            |  |                                 |  |
| 8:1c11      | 1.95           | 2.05  | 0.175      | 0.673 | UFA/SFA                         | 0.69  | 0.69        | 0.047          | 0.948 |            |  |                                 |  |

<sup>a</sup>Standard error of mean; <sup>b</sup>Statistical probability of treatment; <sup>c</sup>Total fatty acids is the sum of identified fatty acids.

Table 2. Total ( $\mu\text{g/g}$  muscle) and specific ( $\text{mg/g}$  fat) CLA contents and its individual isomers (% total CLA) in non-irradiated and irradiated samples of *longissimus dorsi* muscle from lambs (n=20).

| isomers      | non irradiated | irradiated | SEM <sup>a</sup> | <i>p</i> <sup>b</sup> | isomers            | non irradiated | irradiated | SEM <sup>a</sup> | <i>p</i> <sup>b</sup> |
|--------------|----------------|------------|------------------|-----------------------|--------------------|----------------|------------|------------------|-----------------------|
| total CLA    | 204.3          | 212.1      | 26.1             | 0.513                 | c/t12,14           | 1.05           | 1.05       | 0.192            | 0.978                 |
| specific CLA | 14.4           | 14.7       | 1.57             | 0.657                 | t11,c13            | 10.3           | 10.1       | 2.023            | 0.583                 |
| t12,t14      | 1.23           | 1.39       | 0.183            | 0.152                 | c11,t13            | 0.10           | 0.08       | 0.033            | 0.622                 |
| t11,t13      | 2.41           | 2.82       | 0.352            | 0.017                 | t10,c12            | 0.35           | 0.31       | 0.079            | 0.601                 |
| t10,t12      | 0.47           | 0.43       | 0.056            | 0.310                 | c9,t11             | 78.0           | 77.0       | 2.49             | 0.133                 |
| t9,t11       | 2.17           | 2.92       | 0.084            | 0.0001                | t7,c9 <sup>c</sup> | 2.91           | 2.94       | 0.187            | 0.892                 |
| t8,t10       | 0.18           | 0.20       | 0.037            | 0.560                 | total <i>t,t</i>   | 6.87           | 8.18       | 0.449            | 0.0001                |
| t7,t9        | 0.35           | 0.38       | 0.028            | 0.188                 | total <i>c/t</i>   | 92.8           | 91.4       | 0.429            | 0.0001                |
| t6,t8        | 0.05           | 0.04       | 0.020            | 0.494                 | total <i>c,c</i>   | 0.36           | 0.37       | 0.072            | 0.843                 |

<sup>a</sup>Standard error of mean; <sup>b</sup>Statistical probability of treatment. <sup>c</sup>This CLA isomer co-eluted with minor amounts of the t8,c10 isomer.

#### 4. CONCLUSIONS

The results indicate that the irradiation treatment of vacuum-packaged frozen lamb meat, under maximum doses (7 kGy), does not change its fatty acid profile and CLA contents. In addition, the gamma irradiation does not show a significant loss of the nutritional value of meat fatty acids. In contrast, the irradiation of meat appears to decrease the percentage of total *cis/trans* CLA isomers, including the two bioactive isomers (c9,t11 and t10,c12), and increase the relative proportion of total *trans,trans* isomers.

#### Acknowledgements

Technical assistance (Eng<sup>a</sup> Paula Matos, CHIP - Centro de Higienização por Ionização de Produtos S. A., Sacavém, Portugal), and financial support (grants AGRO/2003/512 and CIISA/2002/52) are acknowledged.

#### References

- [1] - K.W.J. Wahle, S.D. Heys, D. Rotondo - Prog. Lipid Res. **43** (2004) 553
- [2] - N. Sehat, J.K. Kramer, M.M. Mossoba, J.A. Roach, M.P. Yurawecz, K. Eulitz, Y. Ku - Lipids **33** (1998) 963
- [3] - J.M. Griinari, D.E. Bauman - *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1., AOCS Press, Champaign, IL, (1999)
- [4] - S.R. Kanatt, R. Chander, A. Sharma - Food Chem. **97** (2006) 80
- [5] - US FDA - **62** (1997) 64,107
- [6] - M. Grolichová, P. Dvořák, H. Musilová - Acta Vet. BRNO **73** (2004) 143
- [7] - D.U. Ahn, C. Jo, M. Du, D.G. Olson, K.C. Nam - Meat Sci. **56** (2000) 203
- [8] - C. Alfaia, V. Ribeiro, M. Lourenço, M. Quaresma, S. Martins, A. Portugal, C. Fontes, R. Bessa, M. Castro, J. Prates - Meat Sci. **72** (2006) 425
- [9] - A.M. Raddy, R.J. Maxwell, E. Wierbicki, J.G. Phillips - Rad. Phys. Chem. **31** (1988) 195
- [10] - P. Gadgil, J.S. Smith, K.A. Hachmeister, D.H. Kropf - J. Agr. Food Chem. **53** (2005) 1890
- [11] - P. Gadgil, J.S. Smith - J. Agr. Food Chem. **54** (2006) 4896
- [12] - British Department of Health - Report on Health and Social Subjects **46** (1994)
- [13] - L. Yang, L.K. Leung, Y. Huang, Z.Y. Chen - J. Agr. Food Chem. **48** (2000) 3072

# FATTY ACID COMPOSITION, OCTADECADIENOIC CONJUGATED ISOMERS AND LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANT VITAMINS IN THREE COMMERCIAL AZOREAN CHEESES

*Pestana<sup>1,2\*</sup>, J.M.; Martins<sup>1</sup>, S.I.V.; Alfaia<sup>1</sup>, C.M.M.; Alves<sup>3</sup>, S.P.A.; Bessa<sup>3</sup>, R.J.B.; Castro<sup>2</sup>, M.L.F. and Prates<sup>1</sup>, J.A.M.*

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - CIISA, Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia - Centro de Estudos Farmacêuticos, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup> Estação Zootécnica Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.  
tel. 213652890, fax. 213652895, [jpestana@estm.ipleiria.pt](mailto:jpestana@estm.ipleiria.pt)

**Key words:** commercial Azorean cheeses, fatty acids, CLA isomers, vitamin E,  $\beta$ -carotene.

**Abstract:** A number of studies have shown the positive effects of pasture-based diets on the fatty acid content of milk fat. In addition, it is well known that Azores has very good quality pastures for grazing milk cows. Thus, the aim of this study was to characterise and compare the fatty acid composition, conjugated linoleic acid (CLA) isomers and lipid-soluble antioxidant vitamins in three commercially important Azorean cheeses (Terra Nostra, Valformoso and Loreto). Fatty acid profile was determined by GC/FID and CLA isomers were quantified by silver ion-high performance liquid chromatography ( $\text{Ag}^+$ -HPLC). The lipid-soluble antioxidant vitamins, vitamin E homologues and  $\beta$ -carotene, were simultaneously quantified by normal-phase HPLC, using fluorescence (tocopherols) and UV-visible photodiode array ( $\beta$ -carotene) detections in tandem. Regarding the PUFA/SFA index and n-6/n-3 PUFA ratio, values were similar for all the three cheeses. The values of n-6/n-3 index varied from 2,24 to 2,53, which are inside the recommended values for the human diet ( $<4,0$ ). The specific content of CLA isomers, which ranged from 12,39 to 14,82 mg/g, did not show significant differences among the analysed cheeses. The  $\beta$ -carotene contents depicted similar values for both cheeses ( $4,22\pm 0,44$   $\mu\text{g/g}$  fat in Terra Nostra cheese and  $4,02\pm 0,66$   $\mu\text{g/g}$  fat in Loreto cheese), but higher values than Valformoso cheese ( $3,42\pm 0,43$   $\mu\text{g/g}$  fat). On the other hand, the median contents of  $\alpha$ -tocopherol were higher in Terra Nostra cheese ( $67,43$   $\mu\text{g/g}$  fat), intermediate in Loreto cheese ( $62,88$   $\mu\text{g/g}$  fat) and lower in Valformoso cheese ( $59,93$   $\mu\text{g/g}$  fat). In conclusion, Loreto, Terra Nostra and Valformoso cheeses seem to have a similar fat composition. Although showing low values of the PUFA/SFA index, this fat seems to be characterised by high CLA contents, medium levels of lipid-soluble vitamins and a healthy n-6/n-3 index.

## 1. INTRODUCTION

Due to the evolution of consumers demand, more attention has been given to traits related to food safety, health and nutritional value [1]. Fatty acid composition, which is strongly related with several human diseases, particularly cardiovascular diseases, atherosclerosis and some types of cancer, has a major role in nutritional value of milk lipid for human consumption. Current nutritional recommendations are that the PUFA/SFA ratio in human diet should be above 0,45 and, within the PUFA, the n-6/n-3 ratio should not exceed 4,0 [2]. Recently, research focused on conjugated linoleic (CLA) has been increasing due to its potential health benefits such as anticancerigenic, antiatherogenic, antidiabetic and antiadipogenic [3]. Food products from ruminants are the richest source of this fatty acid for humans, with milk having

higher CLA concentrations than meat [1]. Among factors affecting this concentration, animal diets appear the most important [4]. Cheese made of milk from cows grazed on pastures had a more favorable fatty acid profile than all other cheese types [5]. Milk fat represents a good dietary source of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene [6], which exerts their antioxidant activity in biological tissues as well as in foods.  $\beta$ -carotene and retinol scavenge both singlet oxygen and lipoperoxides, thus preventing or limiting the oxidation of fatty acid [7]. The purpose of this work was to characterise the lipid composition, octadecadienoic conjugated isomers and lipid-soluble antioxidant vitamins in commercial Azorean cheeses.

## 2. MATERIALS AND METHODS

The samples were taken, in duplicate, from 10 different commercial lots of Terra Nostra, Loreto and Valformoso cheeses. All cheese samples were homogenized using a food processor (3 × 5s), vacuum packed and stored at -21°C until required for analysis. FAME were extracted, separated, identified and quantified as described by NP-EN ISO 5508, 1996 [8]. Gas chromatography analyses of FAME were performed with an Agilent HP 6890 gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID). From the same FAME solution, methyl esters of CLA isomers were individually separated by triple silver-ion columns in series, using an HPLC system equipped with autosampler and diode array detector (DAD) adjust to 233nm. The separation conditions, as well as the identification and quantification of CLA isomers as described by Alfaia *et al.* [9]. The vitamin E and  $\beta$ -carotene were extracted from cheeses, after direct saponification with saturated methanolic KOH solution, according to the procedure of Prates *et al.* [10]. The vitamin E homologues and  $\beta$ -carotene, were simultaneously quantified by normal-phase HPLC, using fluorescence (tocopherols) and UV-visible photodiode array ( $\beta$ -carotene) detections in tandem, as described in Prates *et al.* [10]. Statistical treatment of data was conducted by ANOVA at a significance level of 5% ( $H_0 = p < 0,05$ ), using the one-way ANOVA procedure of SAS.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The results concerning the total lipids (%), partial sums (g/100g FA), nutritional ratios, CLA isomers and specific  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol contents in three commercial Azorean cheeses are presented in Table 1. The total lipid content, which ranged from 21,74 to 22,17 g/100g cheese, did not show significant differences among cheeses ( $P < 0,05$ ). These results are in agreement with those reported in the literature. In general, Loreto and Valformoso had a different fatty acid profile in contrast with Terra Nostra. This later cheese exhibited higher values of SFA and MUFA and lower levels of TFA and PUFA, than the others. Regarding PUFA/SFA ratio, the values are lower than the recommended values for human diets for all cheeses; similar results were reported in cheese produced in Portugal Continental [11]. The n-6/n-3 ratios were 2,30 for Loreto, 2,53 for Terra Nostra and 2,24 for Valformoso. All these results are inside the recommended values for the human diet. Moreover, the Valformoso cheese presented the greater value of total CLA (3,32 mg/g cheese) compared to Loreto (3,05 mg/g cheese) and Terra Nostra (2,68 mg/g cheese). The results obtained are higher than those reported for cheeses produced in Portugal Continental. The average of CLA specific contents in the three Azorean cheeses is 13,79 mg/g fat that is a lower value comparing with German and French cheeses. CLA levels are higher in cows grazing new growth than in cows grazing more mature pasture [12]. This fact justifies the higher values founded for specific CLA



contents in Azorean cheeses. The specific  $\beta$ -carotene presented identical concentrations between Loreto and Terra Nostra cheeses, but was lower in Valformoso cheese ( $P < 0,05$ ). Also, the specific average  $\beta$ -carotene in Azorean cheeses was  $3,96 \mu\text{g/g}$  fat, higher than those previously reported for Netherlands cheeses ( $1,6\text{--}2,0 \mu\text{g/g}$  fat) [13]. The specific  $\alpha$ -tocopherol contents in Terra Nostra was higher than in Valformoso cheese ( $P < 0,05$ ). In general, the results obtained for the specific  $\alpha$ -tocopherol were higher than those described for Italian cheeses [6]. As mentioned before, the wide variation of the lipid-soluble antioxidants found in cheese is highly affected by animal's diet [6].

#### 4. CONCLUSION

In conclusion, no major differences were found in the fat composition of the three analysed cheeses. In spite of having a high relative portion of saturated fatty acids, and therefore a low PUFA/SFA ratio, this fat seems to have a good n-6/n-3 nutritional index, high CLA contents and intermediate levels of lipid-soluble antioxidant vitamins.

#### Acknowledgements

Financial support (grants POCTI/CVT/2002/44750 and Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, FF-UL) is acknowledged.

#### References

- [1] - N. Atti, H. Rouissi, M. H. Othmane – Milk production, milk fatty acid composition and CLA content in dairy ewes raised on feedlot or grazing pasture. *Live. Sci.* (2006)
- [2] - Department of Health - Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report on Health and Social Subjects N° 46 (1994) HMSO, London.
- [3] - M. Pariza and M.E. Cook - The role of CLA in health. *Int. Dairy. J.* **8** (1998) 459-462
- [4] - R.C. Khanal, K.C. Olson – Factors affecting CLA content in milk, meat and egg: a review. *Pak. J. Nutr.* **3** (2004) 82-98.
- [5] - C. Hauswirth, R.L.S. Martin and H. J. Beer. - High n-3 fatty acid content in Alpine Cheese the basis for an Alpine Paradox. *Cir. Am. H. Ass.* (2004)
- [6] - G. Panfili, P. Manzi and L. Pizzoferrato. -High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes and retinol and its geometric isomers in Italian cheeses. *Analyst*, **119** (1994) 1161-1165.
- [7] - J.K. Donnelly and D.S. Robinson. - Invited review free radicals in food. *Fre. Rad. Res.* **22** (1995), 147-176.
- [8] - NP-EN ISO 5508 - Gorduras de origem animal e vegetal. Análise por cromatografia em fase gasosa de ésteres metílicos de ácidos gordos. (1996)
- [9] - C. Alfaia, V. Ribeiro, M. Lourenço, M. Quaresma, S. Martins, A. Portugal, C. Fontes, R. Bessa, M. Castro, J. Prates . - *Meat Sci.* **72** (2006) 425.
- [10] - J. Prates, M. Quaresma, R. Bessa, C. Fontes, C. Alfaia – *Food. Chem.* **94** (2006) 469
- [11] - S. Martins, C. Alfaia, P. Lopes, M. Castro and J. Prates – Contents of CLA isomers in Portuguese ruminat foods and estimation of their contribution for daily intake. In publication.
- [12] - P.W. Parodi.- Conjugated linoleic acid. *Encyclopaedia of dairy sciences*, Vol.3 H. Roginski., J.W. Fuquay and PF Fox. (Eds) Academic Press, London, 2002.
- [13] - P. Hulshof, T. Van Roekel-Jansen. - Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in the Netherlands. *J. Food Comp. anal.* **19** (2006), 67-75.

**Table 1.** Total lipids, partial sums of fatty acids, nutritional ratios, and contents of CLA isomers,  $\beta$ -carotene and tocopherol in Loreto, Terra Nostra and Valformoso cheeses.

|  | Cheeses                     |                           |                           |
|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|  | Loreto                      | Terra Nostra              | Valformoso                |
| <b>Total lipids (g/100g cheese)</b>  | 21,74 <sup>a</sup> ± 1,90   | 21,76 <sup>a</sup> ± 0,95 | 22,17 <sup>a</sup> ± 1,69 |
| <b>Partial sums (g/100g FA)</b>  |                             |                           |                           |
| $\Sigma$ SFA   | 61,86 <sup>a</sup> ± 0,99   | 65,22 <sup>b</sup> ± 0,97 | 63,11 <sup>c</sup> ± 0,84 |
| $\Sigma$ MUFA  | 27,52 <sup>a</sup> ± 2,14   | 28,26 <sup>a</sup> ± 1,39 | 27,15 <sup>a</sup> ± 0,61 |
| $\Sigma$ TFA   | 2,95 <sup>a</sup> ± 0,92    | 1,35 <sup>b</sup> ± 0,86  | 2,70 <sup>a</sup> ± 0,27  |
| $\Sigma$ PUFA  | 2,95 <sup>a</sup> ± 0,14    | 2,54 <sup>b</sup> ± 0,20  | 2,89 <sup>a</sup> ± 0,17  |
| $\Sigma$ n-3   | 0,72 <sup>a</sup> ± 0,05    | 0,65 <sup>a</sup> ± 0,11  | 0,72 <sup>a</sup> ± 0,06  |
| $\Sigma$ n-6   | 1,66 <sup>a</sup> ± 0,08    | 1,61 <sup>a</sup> ± 0,10  | 1,62 <sup>a</sup> ± 0,11  |
| <b>Ratios</b>  |                             |                           |                           |
| PUFA/SFA   | 0,05 <sup>a</sup> ± 0,002   | 0,04 <sup>b</sup> ± 0,003 | 0,05 <sup>a</sup> ± 0,003 |
| n-6/n-3  | 2,30 <sup>a</sup> ± 0,10    | 2,53 <sup>a</sup> ± 0,39  | 2,24 <sup>a</sup> ± 0,14  |
| <b>CLA</b>   |                             |                           |                           |
| Total (mg/g cheese)  | 3,05 <sup>a</sup> ± 0,91    | 2,68 <sup>a</sup> ± 0,96  | 3,32 <sup>a</sup> ± 1,45  |
| Specific (mg/g fat)  | 14,28 <sup>a</sup> ± 4,30   | 12,39 <sup>a</sup> ± 4,58 | 14,82 <sup>a</sup> ± 6,27 |
| <b>Specific contents of <math>\beta</math>-carotene (<math>\mu</math>g/g fat)</b>    | 4,02 <sup>a</sup> ± 0,67    | 4,22 <sup>a</sup> ± 0,44  | 3,42 <sup>b</sup> ± 0,43  |
| <b>Specific contents of <math>\alpha</math>-tocopherol (<math>\mu</math>g/g fat)</b> | 62,88 <sup>a,b</sup> ± 6,20 | 67,43 <sup>a</sup> ± 5,63 | 59,93 <sup>b</sup> ± 6,60 |

Significance: means in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0,05$ ); SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; TFA, *trans* fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

$\Sigma$ n-3 = sum of 18:3n-3, 20:3n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3;  $\Sigma$ n-6 = 18:2n-6 and 20:4n-6; n-6/n-3 = n-6/n-3 ratio [(sum of 18:2n-6 and 20:4n-6)/(sum of 18:3n-3, 20:3n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3)]. PUFA/SFA = polyunsaturated/saturated ratio [(sum of 18:2, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:3n-3, 20:4n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3)/(sum of 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0 and 20:0)].

# INFLUÊNCIA NOS TEORES DE METANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES PELAS LEVEDURAS *Dekkera bruxellensis* EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES

Silva Rebelo, C.; Rodrigues da Silva, L.\*

Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Agro-Alimentares, Viseu, Portugal.

\*Tel +351-232446600 Fax 232426536 e-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** metanol, álcoois superiores, *Dekkera bruxellensis*.

**Resumo:** Este trabalho teve como objectivos analisar a influência das leveduras *Dekkera bruxellensis* em vinhos tintos Touriga Nacional durante um período de incubação de 2 meses ao nível dos teores de metanol e álcoois superiores (1-propanol, isobutanol, isoamílico e 2-butanol), tendo-se verificado variações pouco significativas a nível do 1-propanol e isobutanol. Os teores em metanol e álcool isoamílico evoluções equivalentes, ou seja à medida que um aumenta o outro também aumenta, ou vice-versa. No entanto as variações ao nível comparativo entre as diferentes amostras, mostraram que nem sempre estes dois compostos apresentam a mesma evolução, por exemplo para as amostras L69 e L71 apresentam teores máximos na primeira amostragem (após 15 dias) e diminuíram ao longo do período de incubação. Enquanto que para as amostras L71 e L75 os teores de metanol e álcool isoamílico apresentaram um aumento ao longo do período de incubação, apresentando um valor máximo na última amostragem.

## INTRODUÇÃO

Os álcoois superiores são álcoois (com mais de dois átomos de carbono na sua molécula) formados durante o processo oxidativo. Estão praticamente ausentes nos mostos, encontrando-se nos vinhos em teores relativamente elevados, apresentando valores normalmente superiores a 100 mg/L e podendo atingir algumas centenas de mg/L.

Estes compostos formam-se no decorrer dos processos fermentativos dos mostos, sendo diversas as causas da sua origem. A principal origem dos álcoois superiores está associada à degradação dos aminoácidos (valina e leucina, principalmente) mediante um mecanismo que engloba desaminação, descarboxilação e redução, sucessivamente.

Aos álcoois superiores são atribuídos odores “grosseiros e ásperos”, que conferem aos vinhos um aroma “vinoso” muito acentuado.

Os álcoois que possuem até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos, tradicionalmente associados a bebidas destiladas. Estes são responsáveis directos pelo odor da bebida, possuindo aromas característicos, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isómeros.

As leveduras *Dekkera bruxellensis* são responsáveis por um conjunto de alterações sensoriais interessantes, sendo caracterizadas actualmente como picante, odor a fumo, suor de cavalo, urina de rato, odor farmacêutico, entre outros (Heresztyn, 1986; Chatonnet *et al.*, 1995). Estas leveduras são fortemente acidogénicas, apresentando apetência para produzir ácido acético, além deste composto estão descritas outras substâncias que podem ser produzidas pela *Dekkera bruxellensis*, tais como: tetrahidropiridinas, responsáveis pelo odor a urina de rato e os fenóis voláteis, tais como etilfenóis e vinilfenóis, responsáveis pelo odor a estábulo (suor de cavalo). Além destes compostos, outros compostos, como o acetato de etilo, o glicerol, os aldeídos (acetaldeído), os ácidos succínico, pirúvico, isobutírico, isovalérico e 2-metilbutírico e as aminas biógenas podem também contribuir para o perfil sensorial dos vinhos

contaminados (Caruso *et al.*, 2002). Até à data não existem trabalhos publicados sobre a influência das leveduras *Dekkera bruxellensis* sobre os teores de metanol e álcoois superiores.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo utilizou-se vinho tinto *Touriga Nacional* da região do Dão, distribuído por 7 amostras de 5 litros, das quais 6 foram inoculadas com estirpes de *Dekkera bruxellensis* (L69, L71, L73, L74, L75, L78), e uma amostra testemunha (T – Testemunha), estas amostras foram incubadas a 25 °C durante dois meses, sendo recolhidas amostras para análise em períodos intervalados de 15 dias, durante dois meses (Quadro 1).

**Quadro 1** - Microrganismos utilizados no estudo.

| <b>Amostra</b> | <b>Microrganismos</b>                           |
|----------------|---|
| T              | Testemunha a 18°C                               |
| L69            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L71            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L73            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L74            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L75            | <i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 74 <sup>T</sup> |
| L78            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |

Para determinação dos teores em metanol e álcoois superiores utilizou-se um Cromatógrafo de fase gasosa equipado com detector de ionização de chama (FID).

As amostras de vinho foram destiladas durante a determinação do Teor Alcoómetro Volumico, o qual foi recolhido, procedendo-se de seguida à preparação da amostra para determinação dos álcoois superiores. A preparação da amostra consistiu na mistura de 10cm<sup>3</sup> de destilado com 1cm<sup>3</sup> da solução do padrão interno, a qual foi seguidamente injectada no cromatógrafo a um volume de 1,0 µl.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os teores de metanol e álcoois superiores estão representados na Tabela 1.

Dos resultados obtidos verificámos que os teores em 1-propanol e isobutanol sofreram variações pouco significativas.

O metanol e o álcool isoamílico apresentaram algumas variações ao nível das diversas amostras, verificando-se que existe uma relação directa entre o metanol e o álcool isoamílico, normalmente quando os teores de metanol aumentam os teores de álcool isoamílico também aumentam, quando os teores de metanol diminuem, os teores em álcool isoamílico também diminuem.

Estes dois álcoois apresentaram variações diferentes entre as amostras, por exemplo para as amostras L69 e L71 apresentam teores máximos na primeira amostragem (após 15 dias) e diminuíram ao longo do período de incubação. Enquanto que para as amostras L71 e L75 os teores de metanol e álcool isoamílico apresentaram um aumento ao longo do período de incubação, apresentando um valor máximo na última amostragem.

| Amostras |                | Metanol<br>(mg/100 cm <sup>3</sup> ) | 1-propanol<br>(mg/100 cm <sup>3</sup> ) | Isobutanol<br>(mg/100 cm <sup>3</sup> ) | Isoamílico<br>(mg/100 cm <sup>3</sup> ) | 2-butanol<br>(mg/100 cm <sup>3</sup> ) |
|----------|----------------|--------------------------------------|---|---|---|--|
| T        | 1 <sup>a</sup> | 151,8 (0,31)                         | 24,3 (0,1)                              | 61,5 (0,3)                              | 234,3 (0,3)                             | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 153,0 (1,1)                          | 24,0 (0,9)                              | 61,4(0,6)                               | 236,5 (1,7)                             | 30 (0,5)                               |
|          | 3 <sup>a</sup> | 153,7 (0,9)                          | 24,8 (1,1)                              | 61,6 (3,0)                              | 235,6 (1,2)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 154,0 (0,8)                          | 24,2 (2,1)                              | 61,9 (0,1)                              | 235,8 (0,4)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 154,3 (0,7)                          | 24,7 (0,3)                              | 61,3 (0,3)                              | 236,4 (0,6)                             | nq                                     |
| L69      | 1 <sup>a</sup> | 169,3(2,4)                           | 18,3(0,2)                               | 66,5(0,7)                               | 253,1(0,6)                              | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 161,8(4,3)                           | 19,4(0,4)                               | 63,1(0,7)                               | 241,6(2,8)                              | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 153,7 (0,2)                          | 17,4 (1,1)                              | 61,1 (0,9)                              | 233,1 (0,7)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 149,7 (0,7)                          | 17,9 (0,2)                              | 60,9 (1,3)                              | 229,2 (0,2)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 147,3 (1,1)                          | 18,1 (1,1)                              | 59,1 (0,4)                              | 225,9 (1,1)                             | nq                                     |
| L71      | 1 <sup>a</sup> | 154,6 (0,6)                          | 18,9 (0,4)                              | 62,1 (1,1)                              | 234,9 (3,1)                             | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 160,1(4,8)                           | 19,4(0,4)                               | 63,8(0,1)                               | 242,8 (1,4)                             | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 185,6 (3,1)                          | 19,9 (0,9)                              | 63,7 (0,9)                              | 282,4 (1,2)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 188,1 (0,2)                          | 19,6 (0,6)                              | 64,1 (0,2)                              | 285,3 (0,6)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 192,3 (0,6)                          | 19,8 (0,2)                              | 64,4 (0,7)                              | 290,2 (1,9)                             | nq                                     |
| L73      | 1 <sup>a</sup> | 208,5 (2,8)                          | 18,9 (0,6)                              | 62,0 (0,3)                              | 313,9 (0,9)                             | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 157,0(1,5)                           | 18,5(0,1)                               | 62,5(0,4)                               | 239,1(1,0)                              | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 156,6(0,2)                           | 18,4(0,1)                               | 62,1(0,6)                               | 238,0(0,1)                              | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 150,5(0,2)                           | 17,8(0,1)                               | 60,3(0,6)                               | 228,7(0,1)                              | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 145,8 (0,9)                          | 17,9 (0,3)                              | 58,6 (0,5)                              | 218,3 (2,1)                             | nq                                     |
| L74      | 1 <sup>a</sup> | 156,2(1,3)                           | 17,0(0,1)                               | 62,5(0,4)                               | 238,3(0,9)                              | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 154,5(2,6)                           | 18,8(0,2)                               | 67,4(0,3)                               | 234,4(1,0)                              | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 153,0 (0,9)                          | 18,0 (0,1)                              | 62,1 (0,6)                              | 234,4 (2,5)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 152,0 (0,2)                          | 18,2 (0,4)                              | 62,7 (0,3)                              | 230,1 (2,0)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 150,9 (1,2)                          | 17,9 (0,5)                              | 63,3 (0,5)                              | 229,4 (1,1)                             | nq                                     |
| L75      | 1 <sup>a</sup> | 152,6 (1,1)                          | 18,7 (0,5)                              | 61,2 (2,1)                              | 232,9 (0,5)                             | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 157,3(0,1)                           | 18,2(0,1)                               | 63,0(0,3)                               | 233,6(0,1)                              | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 156,0 (0,6)                          | 17,8 (0,5)                              | 61,7 (0,1)                              | 233,6 (2,7)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 157,3 (0,9)                          | 18,6 (0,1)                              | 62,3 (1,4)                              | 238,1 (0,6)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 158,1 (1,1)                          | 20,4 (0,6)                              | 62,3 (0,9)                              | 237,6 (2,5)                             | nq                                     |
| L78      | 1 <sup>a</sup> | 151,6 (0,1)                          | 16,3 (0,5)                              | 60,0 (0,2)                              | 228,9 (0,7)                             | nq                                     |
|          | 2 <sup>a</sup> | 157,8 (0,6)                          | 18,9 (0,4)                              | 63,1 (0,1)                              | 237,8 (0,6)                             | nq                                     |
|          | 3 <sup>a</sup> | 151,5 (0,4)                          | 16,9 (0,9)                              | 61,1 (0,8)                              | 231,3 (1,1)                             | nq                                     |
|          | 4 <sup>a</sup> | 147,1 (0,2)                          | 17,1 (0,7)                              | 61,5 (0,3)                              | 233,9 (1,9)                             | nq                                     |
|          | 5 <sup>a</sup> | 147,4 (1,1)                          | 17,3 (1,3)                              | 61,6 (0,4)                              | 234,1 (0,9)                             | nq                                     |

nq- não quantificado

**Tabela 1** - Evolução dos teores em metanol e álcoois superiores.

## REFERÊNCIAS

Caruso, M.; Fiore, C.; Contursi, M.; Salzano, G.; Paparella, A.; Romano, P. (2002b). Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal Microbiology Biotechnology*, **69**: 1775-1782.

Chatonnet, P. (1995). Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. Thèse Doctorat de L'Université de Bordeaux II.

Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal Enology Viticulture*, **46**(4): 463-472.

## COUVES CHUMBADAS

*Silva, N. A. F. \*, Silva, H. F. A., Galego, P., Oliveira, S. , Matos, M. J.*  
*Centro de Investigação de Engenharia Química e Biotecnologia do ISEL/DEQ – Av. Conselheiro*  
*Emídio Navarro, 1, 1959-007 Lisboa, Portugal.*  
Tel: (+351) 21 831 72 65 FAX: (+351) 21 831 72 67 e-mail: nsilva@deq.isel.ipl.pt

**Palavras-chave:** metais tóxicos, couves, consumo humano, tráfego automóvel, SWASV.

**Resumo:** Neste trabalho apresentam-se os resultados de um estudo realizado em couves galegas que mostra a presença de metais tóxicos, nomeadamente chumbo e cádmio, em amostras recolhidas em zonas de cultivo urbanas situadas junto às principais vias de tráfego automóvel da cidade de Lisboa. A determinação dos metais foi efectuada por Voltametria de Redissolução Anódica de Onda Quadrada (SWASV, acrónimo aglófono) após digestão ácida das amostras por tecnologia de microondas. Compararam-se, ainda, estes resultados com os obtidos na análise de couves provenientes de hortas biológicas. Foram também analisadas couves adquiridas em várias superfícies comerciais na perspectiva de que, sendo géneros alimentícios prontamente disponíveis para os consumidores, não é por estes conhecida a sua origem e locais de cultivo. Como esperado o teor mais elevado de cádmio e chumbo foi detectado nas amostras recolhidas no IC19 e na 2ª Circular, locais caracterizados por uma elevadíssima intensidade de tráfego automóvel. Nas zonas de agricultura biológica, afastadas de vias de tráfego automóvel o teor neste metais é inferior. Destaca-se ainda a presença de cádmio e chumbo numa das amostras comerciais analisadas.

### 1. INTRODUÇÃO

Actualmente é frequente constatar a existência de pequenas áreas de exploração agrícola (hortas) junto de vias de elevada intensidade de tráfego automóvel, onde uma variedade significativa de géneros alimentícios é cultivada. Estas pequenas “hortas” são geralmente exploradas por camadas da população com fracos recursos económicos e aposentados que visam ocupar algum do seu tempo livre. Uma preocupação que emerge desta prática, prende-se com o consumo humano dos referidos alimentos. De facto, um número significativo de indivíduos consome produtos agrícolas provenientes destas zonas de cultivo, pensando estar a consumir alimentos saudáveis, livres de quaisquer agentes químicos, quando na realidade está a prejudicar significativamente a sua saúde [1-3]. O tráfego automóvel é, nomeadamente em zonas de média e baixa actividade industrial, a principal fonte de agentes poluentes da atmosfera [4,5], com particular destaque para os metais tóxicos. Estes depositam-se nos solos adjacentes [6], pelo que o problema deve ser encarado com uma grande seriedade. Neste trabalho apresentam-se os resultados de um conjunto de análises efectuadas a couves galegas visando a determinação do teor em chumbo e cádmio. As amostras de couve foram recolhidas em diversas hortas da cidade de Lisboa situadas na berma de vias de elevada intensidade de tráfego automóvel. A quantificação dos metais foi efectuada pela técnica electroanalítica de Voltametria de Redissolução Anódica de Onda Quadrada (SWASV) [7] fortemente vocacionada para a determinação simultânea de metais tóxicos em amostras reais de matriz complexa [8-11]. Os ensaios electroanalíticos foram realizados após digestão ácida das amostras por tecnologia de microondas [12,13]. Esta digestão tem como objectivo a decomposição das amostras (por acção de um agente oxidante) com destruição dos componentes orgânicos e extracção dos elementos metálicos para a solução. A digestão

por microondas resulta da interacção da radiação electromagnética no domínio das microondas com a matéria, produzindo um aquecimento rápido e uniforme potenciando assim a acção do agente oxidante. Desta forma o processo de digestão da amostra torna-se mais rápido e energeticamente mais favorável, com possibilidade de ser aplicado a um maior número de amostras.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Reagentes e Soluções

Em todas as soluções foi utilizado como electrólito suporte  $\text{HNO}_3$  0.1 mol.L<sup>-1</sup>. Esta solução foi preparada a partir de ácido nítrico a 65% da Merck de grau *Suprapur*.

Para a preparação do filme de mercúrio foi utilizada uma concentração de  $5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> em  $\text{Hg}^{2+}$ , a partir de uma solução padrão para absorção atómica de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ , 1000 mg.L<sup>-1</sup> em  $\text{Hg}^{2+}$  de marca Merck. Para a quantificação dos metais, pelo método da adição padrão, foram utilizadas soluções de chumbo e cádmio de concentrações adequadas, preparadas a partir de soluções padrão para absorção atómica de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ , 1000 mg.L<sup>-1</sup> em  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  respectivamente, da marca Merck. Na digestão das amostras foram utilizados como agentes oxidantes  $\text{HNO}_3$  65% Merck *Suprapur* e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% Merck *Suprapur*. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura Milipore com uma resistividade superior a 18,2 M $\Omega$ .cm.

### 2.2 Equipamento

Para a digestão de amostras, foi utilizado um digestor de microondas de vaso aberto CEM STAR SYSTEM 2. Os ensaios de SWASV foram realizadas utilizando um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 10 controlado por computador através do software AUTOLAB GPES (versão 4.6).

Nos ensaios electroanalíticos foi utilizado como eléctrodo de trabalho um filme de mercúrio depositado na superfície de um disco de carbono vítreo de 3 mm de diâmetro, selado com Teflon. O eléctrodo de referência utilizado foi o eléctrodo saturado de calomelanos (ESC) e o eléctrodo auxiliar um fio de platina em espiral.

A célula electroquímica utilizada, consistiu numa célula convencional, tipo PAR, com capacidade para 50 mL de solução coberta com uma tampa de Teflon com várias entradas para introdução dos eléctrodos na solução. Para agitação da solução utilizou-se um agitador magnético comum.

### 2.3 Procedimento

As amostras (folhas de couve galega) foram recolhidas em diversas hortas da cidade de Lisboa tendo como critérios para a selecção de cada local o facto de estes se situarem na berma de vias de elevada intensidade de tráfego e também o facto de os géneros alimentícios aí cultivados serem destinados ao consumo humano. Os locais assim seleccionados foram o IC19, Alfragide (amostra IC19), a 2ª Circular, junto do aeroporto (amostra 2ª Circular), a auto-estrada A1, saída de Santa Iria da Azóia (amostra AE1) e a autoestrada A8, junto a Olival de Basto (amostra AE8). Foi recolhida também uma amostra numa zona de agricultura biológica afastada de vias de elevada intensidade de tráfego automóvel (amostra de “agricultura biológica”). Por fim analisaram-se amostras de couve galega adquiridas em duas superfícies comerciais - amostras Comercial a) e amostra comercial b).

Após recolha as amostras sofreram um tratamento de secagem das folhas de couve em estufa, a 65 °C durante 48 h, com o objectivo de eliminar a água presente. Seguiu-se a trituração das



mesmas com um moinho até se obter um pó fino. Para o processo de digestão foram pesados com precisão analítica 2 g de pó que foi digerido em meio oxidante com o auxílio de microondas e de acordo com o programa que se mostra na tabela 1.

**Tabela 1** - Programa de digestão das amostras por microondas.

| Passo                    | Reagente                          | VOLUME (mL) | Secura | Temperatura (°C) | Tempo (min) |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------|--------|------------------|-------------|
| 1                        | HNO <sub>3</sub> 65%              | 10          | Não    | 150              | 8           |
| 2                        | HNO <sub>3</sub> 65%              | 10          | Não    | 150              | 8           |
| 3                        | HNO <sub>3</sub> 65%              | 10          | Sim    | 150              | 8           |
| 4                        | HNO <sub>3</sub> 65%              | 10          | Sim    | 150              | 8           |
| 5                        | Pausa                             | -           | -      | -                | 2           |
| 6                        | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% | 10          | Sim    | 150              | 8           |
| 7                        | Pausa                             | -           | -      | -                | 2           |
| 8                        | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% | 10          | Não    | 150              | 8           |
| Tempo total de digestão: |                                   |             |        |                  | 52          |

O resíduo resultante da digestão foi dissolvido, a quente, com 20 mL de HNO<sub>3</sub> 0.5 mol.L<sup>-1</sup>, sendo em seguida filtrado, por gravidade, para um balão aferido de 100 mL. Perfez-se o volume com água ultrapura Millipore.

Em seguida procedeu-se à quantificação do teor de cádmio e chumbo nas amostras, por SWASV. Esta quantificação foi efectuada pelo método da adição padrão, onde a 25 mL de amostra (volume utilizado em todos os ensaios) foram adicionados volumes adequados de soluções padrão dos metais em estudo.

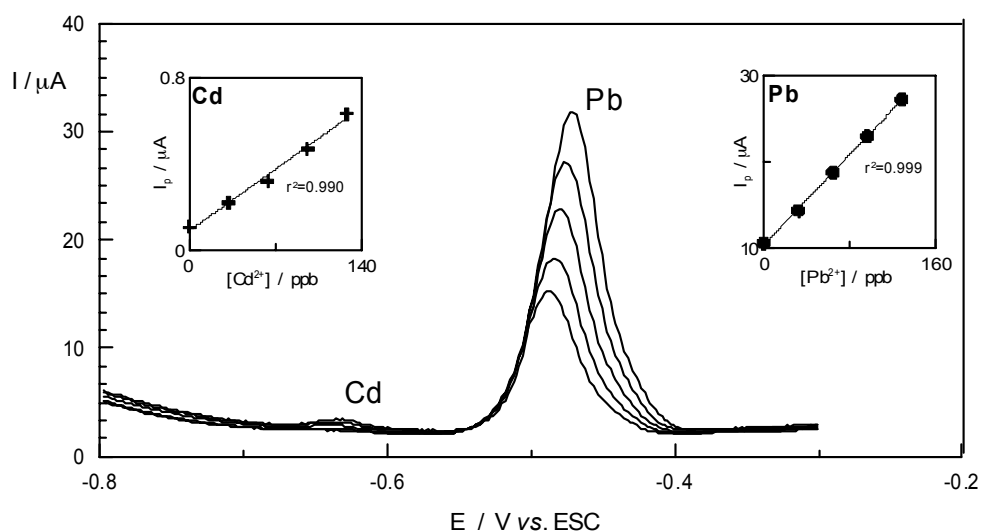
Antes da realização das análises, foram optimizadas as condições operacionais do método de SWASV no que concerne aos parâmetros mostrados na tabela 2. Nesta tabela são apresentados os valores óptimos obtidos para os parâmetros voltamétricos com especial ênfase nas condições de formação do filme de mercúrio.

**Tabela 2** – Condições experimentais para a realização dos ensaios de SWASV

| Parâmetro   | Valor optimizado                       |
|---|--|
| Concentração de mercúrio                                  | 5×10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> |
| Potencial de co-deposição do mercúrio e metais a analisar | -1.0 V                                 |
| Tempo de co-deposição do mercúrio e metais a analisar     | 60 s                                   |
| Potencial de limpeza do eléctrodo                         | +0.3 V                                 |
| Tempo de limpeza do eléctrodo                             | 60 s                                   |
| Frequência da onda quadrada                               | 125 Hz                                 |
| Amplitude da onda quadrada                                | 25 mV                                  |
| Incremento de potencial                                   | 2 mV                                   |
| Desarejamento da solução com azoto                        | 10 min                                 |
| Agitação  | 1000 rpm                               |

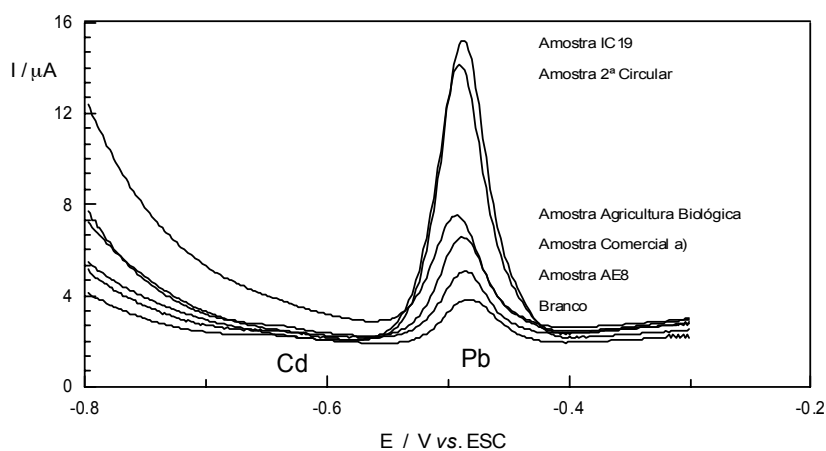
## 2.4 Resultados e discussão

Na figura 1 mostram-se os voltamogramas resultantes da análise voltamétrica efectuada a uma das amostras (IC19), em que voltamograma base corresponde ao sinal da amostra e os restantes voltamogramas às sucessivas adições de solução padrão.



**Fig. 1** – Voltamogramas e rectas de adição padrão obtidos na análise do cádmio e chumbo na amostra IC19.

Na figura 2 mostram-se os voltamogramas obtidos das amostras em que foi detectada a presença de cádmio ou chumbo assim como o voltamograma relativo ao branco da análise. Ao lado, na figura 3, mostra-se no mapa da cidade de Lisboa os locais de recolha das amostras.



**Fig. 2** – Voltamogramas das amostras em que se detectou chumbo e/ou cádmio.



**Fig. 3** – Locais de recolha

Os resultados das análises efectuadas às várias amostras de couve galega são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** – Concentração de cádmio e chumbo obtidas nas amostras de couve galega.

| Amostra               | Concentração<br>(mg / kg matéria seca) |        |
|-----------------------|--|--------|
|                       | Cádmio                                 | Chumbo |
| IC19                  | 0.123                                  | 0.780  |
| 2ª Circular           | 0.198                                  | 2.051  |
| AE1                   | n.d.                                   | n.d.   |
| AE8                   | n.d.                                   | 0.183  |
| Agricultura Biológica | n.d.                                   | 0.306  |
| Comercial a)          | 0.116                                  | 0.180  |
| Comercial b)          | n.d.                                   | n.d.   |

n.d. – não detectado

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 3 pode verificar-se que as amostras que contêm um teor mais elevado de cádmio e chumbo são as recolhidas no IC19 e na 2ª Circular. A esta constatação não é alheio o facto de estas serem efectivamente zonas de elevadíssima intensidade de tráfego automóvel caracterizadas frequentemente por um perfil de circulação de tráfego do tipo “stop and go” originado pelas habituais filas de trânsito. Na amostra A1 não foi detectada a presença de qualquer um dos metais em estudo uma vez que o local de recolha se situa num patamar em plano mais elevado face à via de circulação automóvel. Na amostra AB a presença de chumbo poderá dever-se ao facto de esta zona se situar afastada de vias de elevada intensidade de tráfego automóvel mas junto a uma via de baixa a moderada intensidade. Relativamente às amostras adquiridas em superfícies comerciais não se detectou a presença de nenhum dos metais em estudo na amostra SCb. No entanto, a amostra SCa apresenta um teor significativo em cádmio e chumbo.

### 3. CONCLUSÕES

A existência de metais pesados, nomeadamente chumbo e cádmio, em couves galegas cultivadas nas proximidades de vias de elevado tráfego automóvel foi demonstrada neste estudo. A prática do aproveitamento de taludes próximos às vias rodoviárias deve ser desencorajada ou mesmo proibida pelo perigo que tal prática acarreta para a saúde humana, uma vez que os géneros alimentícios aí cultivados são frequentemente destinados ao consumo humano. A verificação da presença destes metais em amostras comerciais é também deveras preocupante. Não é, contudo, uma constatação que nos surpreenda, se tivermos em conta a existência de grandes explorações agrícolas situadas nas proximidades de auto-estradas e outras vias em que a intensidade de tráfego automóvel é bastante elevada. Este estudo pretende ainda alertar o consumidor para os perigos inerentes a esta prática, e também os organismos competentes para a necessidade de fiscalização e produção de legislação que corrija e regulamente esta actividade.

Recordando que o Regulamento CE n.º 466/2001 da Comissão impõe como limite máximo para o chumbo as 0.2 mg/kg para este tipo de alimentos, constatamos o perigo para a saúde pública que representa o consumo de couves de alguns destes locais amostrados. Mesmo a amostra proveniente da chamada “agricultura biológica” apresenta teores que ultrapassam os limites legais indiciando que estas práticas apenas garantem a ausência de pesticidas. Não evitam a presença de poluentes transportados atmosféricamente nem a absorção pelas plantas de poluentes presentes nos solos como é o caso dos metais pesados.

#### 4. REFERÊNCIAS

- [1] K. Ravindra, L. Bencs, R.V. Grieken - *Sci. Total Environ.* **318** (2004) 1.
- [2] R. Nataf, C. Skorupka, L. Amet, A. Lam, A. Springbett, R. Lathe - *Toxicol. Appl. Pharm.* **214** (2006) 99.
- [3] A. Jin, K. Teschke, R. Copes - *Sci. Total Environ.* **208** (1997) 23.
- [4] J. Nrigau, C. Jinabhai, R. Naidoo, A. Coutsoudis - *Sci. Total Environ.* **191** (1996) 69.
- [5] G. Mercier, J. Duchesne, A.C. Gibergues - *Environ. Pollution* **118** (2002) 285.
- [6] R. Garcia, E. Millán - *Chemosphere* **37** (1998) 1615.
- [7] J. Wang - *Stripping Analysis – Principles, Instrumentation, and Applications*, VCH Publishers, Deerfield Beach, FL (1985).
- [8] M. C. V. Mamani, L. M. Aleixo, M. F. Abreu, S. Rath - *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37** (2005) 709.
- [9] C. Locatelli, G. Torsi - *Microchem. J.* **78** (2004) 175.
- [10] C. Locatelli, *Anal. Chim. Acta* **557** (2006) 70.
- [11] Kh. Z. Brainina, N. Yu. Stozhko, G. M. Belysheva, O. V. Inzhevatova, L. I. Kolyadina, C. Cremisini, M. Galletti - *Anal. Chim. Acta* **514** (2004) 227.
- [12] P. Lidstrom, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman - *Tetrahedron* **57** (2001) 9225.
- [13] A.V. Filgueiras, J.L..Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho - *Talanta* **53** (2000), 433.

# ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS PRODUZIDAS PELAS LEVEDURAS *Dekkera bruxellensis* EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES

Silva Rebelo, C.; Rodrigues da Silva, L.\*

Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Agro-Alimentares, Viseu, Portugal.

\*Tel +351-232446600 Fax 232426536 e-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** *Dekkera bruxellensis*, vinho, análises físico-químicas

**Resumo:** Este trabalho teve como objectivos analisar a influência das leveduras *Dekkera bruxellensis* em vinhos tintos Touriga Nacional durante um período de incubação de 2 meses ao nível dos principais parâmetros físico-químicos (acidez total, acidez volátil, pH, sulfuroso livre, sulfuroso total, teores em etanol, massa volúmica, extracto seco), tendo-se verificado variações significativas fundamentalmente ao nível da acidez volátil.

## 1. INTRODUÇÃO

O vinho é um produto obtido pela conjugação de vários processos biológicos levados a cabo por microrganismos (bactérias e fungos). As leveduras são importantes neste processo, devido à sua acção na fermentação alcoólica, mas também por alguns defeitos no vinho, produzindo alterações ao nível físico-químico e sensorial, levando a perdas económicas consideráveis. Uma das leveduras responsáveis por estes tipos de alterações é a levedura *Dekkera bruxellensis*.

Neste momento estão descritas algumas alterações sensoriais a nível de odor e sabor, classificadas como apresentando odor/sabor a sidra, madeira, picante, fumo, medicina, urina de rato, estábulo (“suor de cavalo”), entre outros, estando normalmente associados à produção de uma grande variedade de compostos secundários pelas leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*.

Apesar da importância que esta levedura tem no sector vitivinícola, apenas foram descritos alguns trabalhos sobre a sua influência em vinhos *Touriga Nacional* (DOC Dão) a nível dos compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2005) e ácidos orgânicos (Valentão *et al.*, 2006).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo utilizou-se vinho tinto Touriga Nacional da região do Dão, o qual foi submetido a uma filtração esterilizante (0,22 µm), sendo posteriormente distribuído por 8 amostras de 5 litros, das quais 6 foram inoculadas com estirpes de *Dekkera bruxellensis* (L69, L71, L73, L74, L75, L78), e uma amostra sem inoculação (T – Testemunha). Estas amostras foram incubadas a 25 °C durante dois meses, sendo recolhidas amostras para análise em períodos intervalados de 15 dias (Quadro 1).

**Quadro 2** – Microrganismos utilizados neste estudo.

| <b>Amostra</b> | <b>Microrganismos</b>                           |
|----------------|---|
| T              | Testemunha a 18°C                               |
| L69            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L71            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L73            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L74            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L75            | <i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 74 <sup>T</sup> |
| L78            | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |

As amostras em estudo foram caracterizadas a nível físico-químico, recorrendo à análise de vários parâmetros representados no Quadro 3, acompanhados dos respectivamente os métodos utilizados.

**Quadro 3** – Metodologia utilizada na caracterização físico-química do vinho.

| <b>Parâmetros analisados</b>   | <b>Metodologia</b>           |
|--------------------------------|------------------------------|
| ◦ Sulfuroso livre              | ◦ MI 08*                     |
| ◦ Sulfuroso total              | ◦ MI 09*                     |
| ◦ Massa volúmica               | ◦ Regulamento CEE n° 2676/90 |
| ◦ Acidez volátil               | ◦ Regulamento CEE n° 2676/90 |
| ◦ Acidez total                 | ◦ Regulamento CEE n° 2676/90 |
| ◦ pH                           | ◦ MI 31*                     |
| ◦ Título Alcoométrico Volúmico | ◦ MI 04*                     |
| ◦ Extracto seco                | ◦ Regulamento CEE n° 2676/90 |

\*- Métodos internos de ensaio da Comissão Vitivinícola da Região do Dão

## **ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

Os resultados obtidos na análise dos vários parâmetros físico-químicos estão apresentados na Tabela 1.

| Amostra | pH   | Sulfuroso livre (mg/l) | Sulfuroso total (mg/l) | Massa volúmica a 20°C (g/cm <sup>3</sup> ) | Acidez volátil (g ácido acético/l) | Acidez total (g/l) | Extracto seco total (g/l) | Título Alcoométrico Volúmico a 20°C (%V/V) |
|---------|------|------------------------|------------------------|--|------------------------------------|--------------------|---------------------------|--|
| 1*-T    | 3.61 | 18                     | 23                     | 0.993892                                   | 0.40                               | 5.43               | 30.0                      | 12.2                                       |
| 2*-T    | 3.61 | 15                     | 20                     | 0.994299                                   | 0.42                               | 5.32               | 31.5                      | 12.3                                       |
| 3*-T    | 3.59 | 13                     | 29                     | 0.992279                                   | 0.45                               | 5.65               | 26.1                      | 12.3                                       |
| 4*-T    | 3.61 | 16                     | 26                     | 0.992574                                   | 0.39                               | 5.45               | 27.4                      | 12.4                                       |
| 5*-T    | 3.61 | 12                     | 25                     | 0.992673                                   | 0.47                               | 5.12               | 27.9                      | 12.5                                       |
| 1-L69   | 3.55 | 13                     | 23                     | 0.993095                                   | 0.81                               | 5.16               | 28.1                      | 12.2                                       |
| 2-L69   | 3.58 | 12                     | 20                     | 0.992620                                   | 0.96                               | 5.32               | 27.1                      | 12.3                                       |
| 3-L69   | 3.55 | 15                     | 28                     | 0.992215                                   | 0.86                               | 5.28               | 26.1                      | 12.3                                       |
| 4-L69   | 3.70 | 12                     | 25                     | 0.992289                                   | 0.93                               | 5.28               | 26.6                      | 12.4                                       |
| 5-L69   | 3.60 | 10                     | 18                     | 0.992691                                   | 0.89                               | 5.49               | 26.6                      | 12.1                                       |
| 1-L71   | 3.58 | 14                     | 31                     | 0.992112                                   | 0.65                               | 4.91               | 25.8                      | 12.3                                       |
| 2-L71   | 3.57 | 15                     | 28                     | 0.993041                                   | 0.96                               | 5.65               | 29.2                      | 12.6                                       |
| 3-L71   | 3.55 | 12                     | 28                     | 0.992215                                   | 0.86                               | 5.50               | 26.3                      | 12.3                                       |
| 4-L71   | 3.62 | 11                     | 25                     | 0.992268                                   | 1.12                               | 5.34               | 26.3                      | 12.4                                       |
| 5-L71   | 3.59 | 10                     | 19                     | 0.992412                                   | 1.74                               | 6.40               | 26.1                      | 12.3                                       |
| 1-L73   | 3.58 | 18                     | 36                     | 0.991910                                   | 0.76                               | 5.44               | 25.0                      | 12.2                                       |
| 2-L73   | 3.57 | 17                     | 21                     | 0.992896                                   | 0.97                               | 5.35               | 28.7                      | 12.6                                       |
| 3-L73   | 3.54 | 15                     | 34                     | 0.992405                                   | 1.02                               | 5.39               | 26.3                      | 12.2                                       |
| 4-L73   | 3.62 | 12                     | 16                     | 0.992644                                   | 1.16                               | 5.54               | 28.1                      | 12.7                                       |
| 5-L73   | 3.71 | 11                     | 15                     | 0.992365                                   | 0.99                               | 5.56               | 26.1                      | 12.2                                       |
| 1-L74   | 3.61 | 8                      | 15                     | 0.992891                                   | 0.84                               | 5.01               | 27.9                      | 12.3                                       |
| 2-L74   | 3.56 | 10                     | 20                     | 0.992696                                   | 0.92                               | 5.43               | 27.9                      | 12.5                                       |
| 3-L74   | 3.53 | 15                     | 33                     | 0.992485                                   | 0.93                               | 5.65               | 26.8                      | 12.3                                       |
| 4-L74   | 3.53 | 11                     | 25                     | 0.992560                                   | 0.96                               | 5.43               | 26.8                      | 12.3                                       |
| 5-L74   | 3.62 | 9                      | 15                     | 0.992332                                   | 0.98                               | 5.76               | 25.5                      | 12.1                                       |
| 1-L75   | 3.58 | 11                     | 35                     | 0.992479                                   | 0.78                               | 4.91               | 26.1                      | 12.1                                       |
| 2-L75   | 3.63 | 15                     | 20                     | 0.994093                                   | 1.05                               | 5.32               | 31.0                      | 12.3                                       |
| 3-L75   | 3.54 | 15                     | 35                     | 0.992210                                   | 0.83                               | 5.43               | 25.8                      | 12.2                                       |
| 4-L75   | 3.60 | 13                     | 14                     | 0.992273                                   | 0.98                               | 5.76               | 26.1                      | 12.3                                       |
| 5-L75   | 3.74 | 15                     | 15                     | 0.992165                                   | 0.99                               | 5.45               | 25.8                      | 12.3                                       |
| 1-L78   | 3.58 | 7                      | 21                     | 0.992896                                   | 0.83                               | 5.28               | 28.7                      | 12.6                                       |
| 2-L78   | 3.58 | 8                      | 19                     | 0.993041                                   | 0.93                               | 5.65               | 29.2                      | 12.6                                       |
| 3-L78   | 3.55 | 13                     | 31                     | 0.992413                                   | 0.93                               | 5.43               | 26.6                      | 12.3                                       |
| 4-L78   | 3.70 | 9                      | 16                     | 0.992374                                   | 1.22                               | 5.24               | 26.6                      | 12.4                                       |
| 5-L78   | 3.60 | 8                      | 15                     | 0.992321                                   | 1.29                               | 5.91               | 25.5                      | 12.1                                       |

\*- 1. Análise aos 15 dias, 2. Análise aos 30 dias, 3. Análise aos 30 dias, 4. Análise aos 45 dias, 5. Análise aos 75 dias

**Tabela 1** – Valores resultantes dos diferentes ensaios físico-químicos para as amostras de vinho analisadas.

Dos resultados obtidos podemos concluir que as variações mais significativas foram obtidas ao nível da acidez volátil. Este resultado é o esperado, uma vez que este composto resulta fundamentalmente do metabolismo oxidativo das bactérias acéticas, mas, tal como referem vários trabalhos científicos que da levedura *Dekkera bruxellensis* apresenta apetência para produzir ácido acético, como resultado do seu metabolismo. Relativamente aos outros parâmetros não se verificaram variações muito significativas.

## REFERÊNCIAS

Valentão, P.; Seabra, R. M.; Lopes, G.; Silva, L. R.; Martins, V.; Trujillo, M. E.; Velázquez, E.; Andrade, P. B. (2006). Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*. 100 (2007): 64-70.

Silva, L. R.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Trujillo, M. E.; Velázquez, E. (2005). Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeasts. *Food Chemistry*, **89**: 185-189.



# **A EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DE ALGUNS ELEMENTOS VESTIGIAIS (ESSENCIAIS E TÓXICOS) NO LEITE HUMANO NO DECURSO DA LACTAÇÃO – ESTUDO DE UMA POPULAÇÃO PORTUGUESA DURANTE AS PRIMEIRAS 16 SEMANAS APÓS O PARTO.**

*Almeida, A.<sup>1\*</sup>, Balcão, V.<sup>2</sup>, Matos, C.<sup>2</sup>, Almeida, C.<sup>2</sup>, Moutinho, C.<sup>2</sup>, Guerra, A.<sup>3</sup>, Rocha, G.<sup>3</sup>,  
Guimarães, H.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>REQUIMTE, Serviço de Química-Física, Faculdade de Farmácia UPORTO, Rua Anibal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal. \*E-mail: aalmeida@ff.up.pt.

<sup>2</sup>Centro de Bioengenharia e FármacoClínica, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Praça 9 de Abril n.º 349, P-4249-004 Porto, Portugal.

<sup>3</sup>Serviço de Neonatologia, Departamento de Pediatria, Hospital de São João, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4202-451 Porto.

Diversos trabalhos têm evidenciado a ocorrência, para vários elementos vestigiais, de uma significativa variação dos seus teores no leite materno ao longo da lactação, geralmente uma diminuição mais ou menos acentuada, no caso de diversos elementos essenciais, padrão de comportamento esse que, pelo contrário, não tende a verificar-se com elementos não essenciais ou “tóxicos”. Também parece que as variações mais significativas ocorrem na passagem de leite de transição para leite maduro.

Na sequência de resultados preliminares anteriormente comunicados [1], apresentam-se agora, neste trabalho, novos dados relativos ao estudo da variação do teor de diversos elementos vestigiais ao longo das primeiras 16 semanas de lactação, estudo este que foi conduzido com uma população portuguesa (n = 31 lactantes) e em que, de modo a se obter uma definição mais fina daquela variação, se efectuaram colheitas às 1, 4, 8, 12 e 16 semanas após o parto.

[1] ALMEIDA Agostinho, BALCÃO Victor, MATOS Carla, ALMEIDA Cristina, MOUTINHO Carla, GUERRA António, ROCHA Gustavo, GUIMARÃES Hercília. Elementos vestigiais no leite materno: variação dos teores de Mn, As, Pb, Co, Ni, Cu, Zn e Se durante as 16 semanas após o parto. Comunicação P2.1. Resumos do 7.º Encontro Nacional de Química, Viseu, Abril 2005.

## ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITES COMERCIAIS

Silva, S.<sup>1,2</sup>, Sepodes, B.<sup>4</sup>, Rocha, J.<sup>4</sup>, Fernandes, J.<sup>1,3</sup>, Mota-Filipe, H.<sup>4</sup>, Figueira, M.E.<sup>4</sup>, Bronze, M.R.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2780 – 901 Oeiras

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127 2780 – 901 Oeiras

<sup>3</sup>Escola de Tecnologia e Gestão Industrial, Estrada Octávio Pato, 2635 – 631 Rio de Mouro

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas 1649 – 019 Lisboa

O azeite é um óleo vegetal obtido por processos de extracção mecânica, podendo ser consumido sem tratamentos adicionais. A composição fenólica do azeite é resultado de uma complexa interacção entre vários factores que incluem a cultivar de oliveira, estado de maturação da azeitona e condições utilizadas no processo tecnológico. O azeite apresenta na sua composição fenólica agliconas de oleuropeína e ligstrósido. Durante a preparação deste óleo, as agliconas referidas sofrem uma transformação na sua estrutura originando as formas dialdeídicas das agliconas de deacetoxi-oleuropeína e ligstrósido, respectivamente.

Vários estudos têm mostrado que a presença de substâncias fenólicas no azeite está relacionada com efeitos benéficos para a saúde, actuando como antioxidantes, antimicrobianos e antiinflamatórios o que tem valorizado o azeite como um dos alimentos funcionais da dieta mediterrânica. Recentemente tem havido bastante interesse na evidência de que a forma dialdeídica da aglicona do deacetoxi-ligstrósido (oleocantal) apresenta actividade anti-inflamatória semelhante à do ibuprofeno (anti-inflamatório não esteróide) (Beauchamp *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foram analisados compostos fenólicos de quatro azeites adquiridos comercialmente. Estas amostras foram seleccionadas por apresentarem do ponto de vista da avaliação sensorial características organolépticas distintas e que caracterizam as suas proveniências. Neste sentido, foram preparados extractos destes produtos e analisados por HPLC com detecção por díodos, fluorescência e electroquímica. O teor total de compostos fenólicos foi determinado utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Denis.

Os resultados permitiram distinguir as amostras em estudo. Foram identificados, nos azeites, compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos álcoois fenólicos como o hidroxitirosol e tirosol, e também do grupo dos secoiridóides como a aglicona da oleuropeína e a forma dialdeídica da aglicona da deacetoxi-oleuropeína. O recurso à detecção electroquímica mostrou ser importante na identificação de compostos fenólicos com actividade antioxidante como o hidroxitirosol.

Foi ainda estudado, em ratos, o efeito antiinflamatório de dois dos azeites com teores diferentes em compostos fenólicos.

Beauchamp G. K., Keast R. S. J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C. H., Smith A. B., Breslin P. A. S. (2005), *Nature* **437**: 45-76.

# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE CHÁS AÇORIANOS

*Andrade, J.C.<sup>1</sup> e Couto, C.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte  
Rua Central de Gandra, 1317, 4585-116 Gandra PRD, Portugal

<sup>2</sup>REQUIMTE, Departamento Química-Física, Faculdade de Farmácia (UP),  
Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030, Porto, Portugal

Email: jose.andrade@iscsn.cespu.pt

O consumo de chá tem sido associado com um risco menor de desenvolver doenças degenerativas, cardiovasculares e cancro. Os benefícios do chá devem-se sobretudo à sua riqueza em compostos polifenólicos com actividade antioxidante. O tipo e o teor de polifenóis depende de vários factores tais como a origem geográfica, variedade, cultivo e processo de fabrico, encontrando-se assim, diferenças não só entre diferentes tipos de chá (preto, verde), como também entre diferentes marcas comerciais. Os Açores são a única região europeia onde se produz chá tendo a sua produção quintuplicado nos últimos 10 anos. Actualmente existem apenas duas marcas, Gorreana e Porto Formoso que produzem diferentes chás pretos e verde. Neste trabalho, foi avaliado o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante total de chás açorianos (pretos e verdes) correntemente comercializados. O reagente de Folin-Ciocalteau foi utilizado para determinar o teor de compostos fenólicos totais tendo como padrão o ácido gálico. A capacidade antioxidante total foi avaliada através de dois métodos: TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), baseado na reacção de descoloração do catião radical ABTS<sup>•+</sup> e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseado na redução do complexo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ.

Uma comparação com algumas das marcas mais comercializadas em Portugal e a literatura é também apresentada.

# AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE DIFERENTES TIPOS DE PÃO

*Fontes, T.; Mota, C.; Pedroso, A.; Faria, R.; Santos, M.*

Centro de Segurança Alimentar e Nutrição (CSAN), Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
(INSA)  
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa – Portugal (e-mail:mariana.coelho@insa.min-saude.pt)

O pão é um dos alimentos mais antigos da Humanidade. Estima-se que o primeiro pão tenha sido feito à 12000 anos. Apesar de Portugal ser o único país da União Europeia em que o consumo de pão não vem decrescendo desde 1980, são cada vez menos os locais onde o Pão é amassado à mão, fermentado a poder de massa azeda e cozido a forno de lenha [1]. Existem diversas variedades de pão, mas a receita base é constituída por farinha de um ou mais tipos de cereais (milho, trigo, centeio, ...), água e sal.

A exemplo de outros alimentos, o pão está hoje sujeito a muitas e curiosas inovações resultantes dos produtos que a industria disponibiliza para o pão saber a pão, para o pão ter cor de pão, para o pão parecer ter sido cozido a lenha, para as “massas congeladas” parecerem pão tradicional.

Este trabalho teve como objectivo avaliar a composição nutricional de diferentes tipos de pão comercializados em grandes superfícies na Região de Lisboa.

Foram analisadas 34 amostras colhidas de acordo com um plano de amostragem anteriormente descrito [2]. Os parâmetros avaliados foram: valor energético, água, cinza, proteína total, gordura, hidratos de carbono e fibra alimentar [3] [4].

Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com a legislação em vigor [5].

[1] Emílio Peres: Alimentos e Alimentação. Pão e Tostas, 2ª ed., Porto, Lello & Irmão Editores, 1996

[2] Castanheira I., Fontes T., Mota C., Pedroso A., Faria R., Fonseca C., Santiago S., Santos M., Calhau M.A. (2005). Data Quality Influence in Recognition of Portuguese Bread Composition. *1st International Food and Nutrition Congress*, 15-18 June, Istanbul

[3] NP 2966 Derivados de cereais. Pão. Determinação dos teores de água e de matéria seca.

[4] Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 17ª ed. Arlington. AOAC, 2000.

[5] Portaria nº 425/98, de 25 de Julho.

# AVALIAÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA DE BOLACHAS: ESTUDO DE MERCADO

Casal, S.<sup>\*1</sup>, Lopes, C.<sup>2</sup>, Silva, J.<sup>2</sup>, Noronha, B.<sup>1</sup>, Mendes, E.<sup>1</sup>, Morais, S.<sup>2</sup>, Delerue-Matos, C.<sup>2</sup>,  
Oliveira, M.B.P.P.<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto

<sup>(2)</sup> REQUIMTE, Grupo de Reacção e Análises Químicas, Instituto Superior de Engenharia do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto  
Tel +351-222078902 Fax +351-222003977 e-mail: sucasal@ff.up.pt

**Palavras-chave:** bolachas, ácidos gordos, isómeros *trans*, obesidade, valor calórico

**Resumo:** A obesidade em Portugal é actualmente um motivo de grande preocupação, nomeadamente nas crianças e jovens. Sabendo que as bolachas estão entre os hábitos de consumo desta faixa etária, o objectivo deste trabalho consistiu em avaliar o teor em gordura nas bolachas de maior consumo em Portugal, com particular incidência na sua composição em ácidos gordos saturados e *trans*.

Foram analisadas 100 amostras diferentes, de entre bolachas de água e sal, digestivas, integrais, maria, simples, recheadas, cobertas, folhadas e wafers. Para a extracção da gordura recorreu-se à extracção assistida por micro-ondas, utilizando um método desenvolvido para o efeito, com custos ambientais mais reduzidos que as extracções clássicas. Para a análise da composição em ácidos gordos recorreu-se à cromatografia gasosa, após hidrólise e derivatização em meio alcalino.

Verificou-se que o teor lipídico médio foi de 16%, com variações entre 5 e 33%. As categorias com maior teor de gordura correspondem às bolachas recheadas, cobertas, folhadas e wafers. De salientar ainda que a maior parte dessa gordura corresponde a gordura saturada. Exceptuando as bolachas tipo maria e água e sal, o teor de ácidos gordos saturados é superior a 50% da totalidade da gordura, chegando a atingir mais de 90% em algumas wafers. Relativamente ao teor de formas *trans* verifica-se, com agrado, que 91% das amostras analisadas apresentam um teor inferior a 1g por 100 g de produto.

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da obesidade da população portuguesa é actualmente motivo de grande preocupação, principalmente ao nível infantil. Embora se dê particular atenção às guloseimas e bolos, as bolachas fazem parte dos hábitos de consumo desta faixa etária. A grande variedade de oferta no mercado e elevada publicitação nos *media* faz com que exista uma preferência cada vez maior por bolachas nutricionalmente menos indicadas, como é o caso das recheadas e cobertas, muito ricas em gordura, em detrimento das bolachas mais tradicionais, como as tipo maria ou água e sal. A constituição dessa mesma gordura, usualmente rica em ácidos gordos saturados que contribuem para a formação da placa aterogénica, é um factor também importante. Acresce ainda a possível presença de ácidos gordos *trans* (AGt), dado que não existe em Portugal restrição ao seu consumo, nem obrigatoriedade de declaração na rotulagem. Entre outros factores, este tipo de ácidos gordos contribui para o aumento dos níveis de LDL-colesterol, redução dos níveis de HDL-colesterol, aumento do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, alteração das concentrações plasmáticas de proteína C reactiva e vários outros parâmetros com efeito adverso na função endotelial (1).

O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar o teor em gordura e a composição em ácidos gordos nas bolachas de maior consumo em Portugal. Por outro lado, sabendo que este tipo de determinações analíticas é frequentemente nefasto para o ambiente, foi também nosso

objectivo recorrer a um processo alternativo de extracção da gordura por microondas, com custos ambientais reduzidos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostragem**

Foram adquiridas 100 amostras de bolachas diferentes, escolhidas de forma a cobrir as de maior consumo e as mais divulgadas pelos media, agrupadas nas seguintes classes: tipo maria (19), simples (21), recheadas (17), água e sal (10), tipo wafer (8), integrais (6), digestivas (5), cobertas (5), de manteiga (3) e tipo folhado (2). As informações veiculadas na embalagem foram cuidadosamente analisadas. No momento da análise as embalagens eram abertas, calculado o peso médio das bolachas e trituradas adequadamente.

De acordo com o código de barras, 53 das bolachas são de fabrico em Portugal, 29 em Espanha, 5 no Brasil, 4 na Alemanha e um menor nº amostras tem origem em outros países como França, Bélgica e República Checa.

### **2.2. Extracção da gordura assistida por microondas (MAE)**

A extracção da gordura assistida por microondas decorreu num sistema Marx-X “1500 W Microwave Accelerated Reaction System” (CEM, Mathews, NC, USA), permitindo a extracção simultânea de 4 amostras. As extracções foram efectuadas numa toma de cerca de 2 g, na presença de igual quantidade de sulfato de sódio anidro e de 5 mg de padrão interno, com 40,0 ml da mistura de solventes éter de petróleo - acetona (2:1; v/v). A extracção foi realizada a 600W com um tempo total de 30 minutos, ao que se seguia o arrefecimento e a evaporação da mistura de solventes em rotavapor. Cada amostra foi extraída em duplicado.

### **2.3. Análise cromatográfica**

Os triacilgliceróis extraídos foram hidrolisados nos seus ácidos gordos constituintes e derivatizados nos ésteres metílicos correspondentes por transesterificação alcalina directa (2). De cada extracto eram preparadas duas derivatizações. As análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso da Chrompack (CP-9001, Holanda), com injector automático e com detecção por ionização em chama, tendo sido utilizada uma coluna cromatográfica CP-Sil 88 de 50 metros (Varian). Foi realizada uma separação com gradiente de temperatura entre 160 e 220°C, a um fluxo de hélio de 120 kPa (3).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

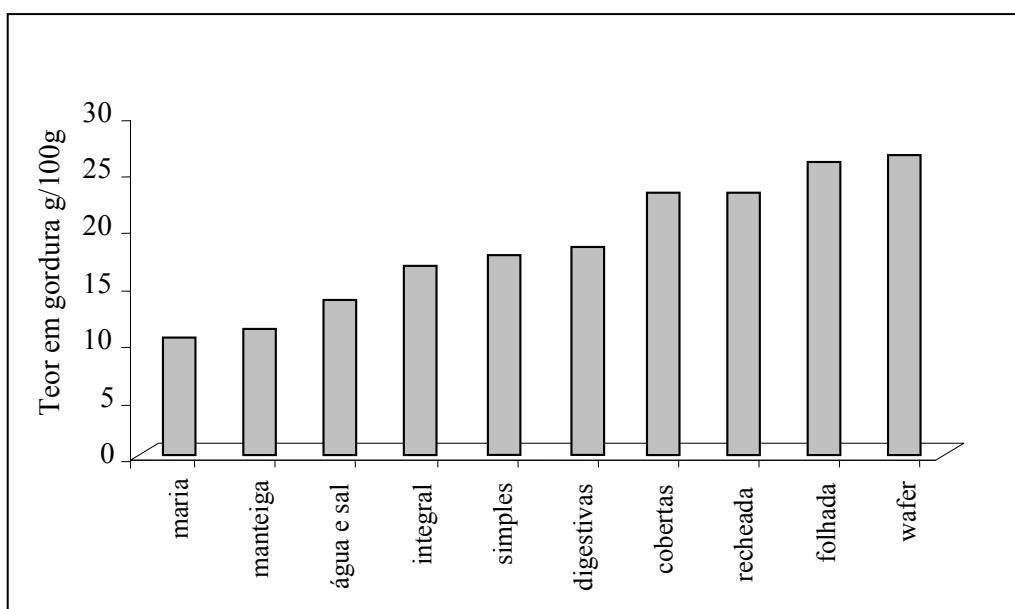
### **3.1. Teor em gordura:**

As amostras foram inicialmente comparadas em termos de gordura total, pelo teor médio de cada classe. Os resultados encontram-se detalhados na figura 1.

Conforme se pode verificar o teor médio em gordura varia de cerca de 10%, em massa, até quase 30%. As bolachas com menor teor em gordura são as tipo maria, as de manteiga e as de água e sal, bem como algumas das incluídas na classes “Simples”. Nestas classes foram incluídas todas as amostras de bolachas doces que, não sendo tipo maria, não continham recheios nem coberturas.

De destacar, no entanto, uma elevada variabilidade dentro de cada classe. Nas bolachas tipo maria, que incluíram 19 amostras diferentes, os teores em gordura variaram de 7 a 15%, tendo numa amostra atingido 24%, mais característico das bolachas recheadas e cobertas.

No que diz respeito às bolachas de manteiga, duas amostras apresentaram um teor total em gordura bastante reduzido (8%) relativamente ao esperado para uma bolacha com esta designação, e numa terceira verificou-se um valor de 17%. Da mesma forma, também nas bolachas integrais se verificou um teor em gordura entre 10 e 21% estando incluídas nas de teor mais elevado as bolachas que, apesar de “integrais”, são frequentemente consumidas como aperitivo. As bolachas “digestivas”, cujo nome é apenas uma designação comercial, apresentam valores em gordura bastante elevados. São obviamente desaconselhadas para aqueles que a adquirem com a intenção de consumir algo mais “saudável”. As classes com maior teor em gordura, com valores superiores a 20%, são as cobertas, as recheadas, as folhadas (palmiers) e as wafers. Sempre que disponibilizado, o teor em gordura indicado na embalagem era próximo do determinado analiticamente.



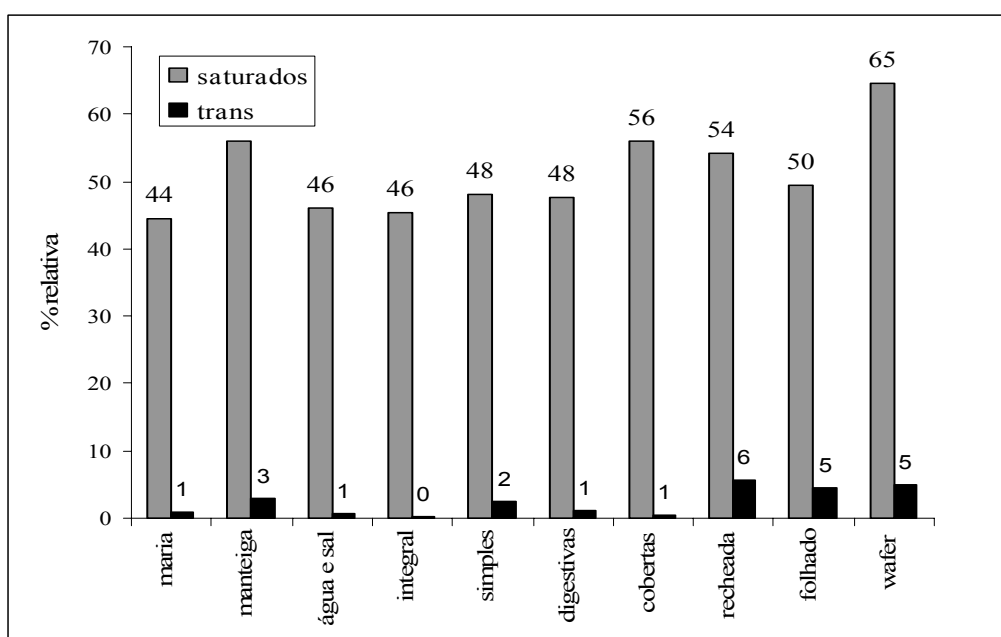
**Figura 1** - Teor médio de gordura média em cada classe de bolachas analisada

Na maior parte dos casos as doses de bolacha aconselhadas rondam as 35g o que corresponde, na generalidade dos casos, a aportes calóricos de cerca de 150-200 kcal. Se este tipo de alimentos faz frequentemente parte da merenda da manhã ou do lanche, muitas vezes acompanhados de um iogurte ou sumo, um aporte de 200 kcal corresponde, numa criança cujo aporte diário ronda as 1300-1500kcal, a mais de 15% de calorias ingeridas, o que é excessivo para qualquer uma das duas refeições.

### 3.2. Composição em ácidos gordos:

Em todas as bolachas analisadas os ácidos gordos maioritários são os saturados com valores médios entre 44 e 65% (Figura 2). De destacar que em algumas amostras de wafers foram detectados valores superiores a 90%. Os valores mais baixos em gordura saturada verificaram-se nas bolachas maria (algumas marcas) e água e sal. Na generalidade os ácidos gordos monoinsaturados apresentam-se em segundo lugar, com 25-41%, seguidos dos polinsaturados com cerca de 10%.

Os ácidos gordos *trans* apresentaram teores muito díspares dentro de cada classe. São, na generalidade valores reduzidos, com 80% das bolachas a apresentarem teores inferiores a 1% na gordura. Embora 5 bolachas, de classes diversas, apresentem teores entre os 4 e os 6%, outras 5 apresentam valores preocupantes entre os 28 e os 40%, o que constitui o factor predominante para os elevados teores médios apresentados em algumas classes. Qualquer destes valores não é intrínseco ao tipo de bolacha mas antes à qualidade da gordura utilizada no seu fabrico, estando, por isso, mais associados com o produtor. As cinco últimas amostras são de um mesmo fabricante, uma marca de renome mundial, tratando-se no entanto de produtos importados. Quando agrupados por país, o teor médio em AGt nas bolachas de fabrico nacional foi de 1,1% ( $\pm 1,3$ ). Os valores alarmantes ocorreram nas bolachas de origem brasileira, embora todas do mesmo fabricante, com  $34,4\% \pm 6,7\%$ , incluindo uma bolacha de água e sal, uma simples e três recheadas.



**Figura 2** - Teor médio de ácidos gordos saturados e *trans* nas classes analisadas

#### 4. CONCLUSÕES

No que concerne às amostras de bolacha analisadas pode concluir-se que apresentam um elevado teor de gordura maioritariamente saturada, apresentando, na sua generalidade, valores de AGt relativamente baixos. Como em qualquer assunto de segurança alimentar é importante que o consumidor não se fidelize a um determinado produto de uma marca mas antes que varie a sua alimentação ou, neste caso, o tipo de bolachas que consome, favorecendo sempre as mais simples.

#### Referências

- [1] – Rapport AFSSA - *Risques et bénéfices pour la santé des AG trans apportés par les aliments* (2005)
- [2] – ISO 5509 – *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of menthyl esters of fatty acids*, Suíça (2000)
- [3] – ISO 15304 – *Animal and vegetable fats and oils – Determination of the content of trans fatty acid isomers of vegetable fats and oils – Gas Chromatographic method*, Suíça (2002)



# AVALIAÇÃO DOS TEORES EM HIDROXIMETILFURFURAL E ÍNDICE DIASTÁSICO EM 18 AMOSTRAS DE MÉIS PROVENIENTES DA REGIÃO DO LUSO

*Santos Dias, B.; Rodrigues da Silva, L.\**

Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Agro-Alimentares, Viseu, Portugal.

\*Telefone 232446600 Fax 232426536 e-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** índice diastásico, hidroximetilfurfural.

**Resumo:** Este trabalho teve como objectivos a determinação dos teores de HMF (5-hidroximetil-2-furaldeído) e índice diastásico em 18 amostras de méis multiflorais provenientes de diferentes apicultores da Região do Luso. Os teores em HMF determinados nas amostras apresentaram variações entre 1,8 a 15,4 mg/Kg de mel. Quanto ao índice diastásico, obtiveram-se valores entre 3,0 e 27,7.

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre parte vivas das plantas que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Decreto-Lei nº 216/2003).

O HMF é um composto que resulta da decomposição dos açúcares, principalmente da frutose. O seu conteúdo depende da composição inicial do mel, da duração e temperatura de armazenamento, já que os ácidos aceleram a decomposição dos açúcares (White, 1979 e 1976; Crane, 1979).

A formação de HMF (hidroximetilfurfural) conduz ao escurecimento do mel e à perda do seu sabor e aroma (Sancho, 1990). O HMF é utilizado como parâmetro de envelhecimento e qualidade do mel, já que o teor deste composto aumenta em méis submetidos a altas temperaturas (Withe, 1979; Huidobro e Simal, 1984; Sancho, 1990). A legislação portuguesa apresenta um valor máximo de HMF de 40 mg/kg.

A diastase é uma enzima produzida principalmente pelas glândulas hipofaríngeas da abelha obreira, desconhecendo-se a sua função no mel.

Apesar de ser a enzima mais resistente do mel ao calor, a sua actividade diminui progressivamente durante o armazenamento, ou então bruscamente com elevados aquecimentos ou com aquecimentos moderados mas prolongados (Sancho, 1990). Devido a isto, o índice diastásico é utilizado como indicador de qualidade e parâmetro de envelhecimento em vários países, nomeadamente em Portugal.

A legislação portuguesa estabeleceu um valor mínimo de 8 para o índice diastásico (na escala de Gothe). Em méis com um conteúdo natural fraco em enzimas, como os méis de *Citrus sp.* e de *Eucalyptus sp.*, o valor mínimo estabelecido é de 3, sempre que o seu conteúdo em HMF seja menor que 15 mg/Kg de mel.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho utilizámos 18 amostras de mel provenientes de diferentes apicultores da região do Luso (cresta de 2005). As amostras foram conservadas em local fresco e foram analisadas no menor espaço de tempo possível.

Para a determinação do HMF utilizámos o método espectrofotométrico de WHITE (1979), método oficial na AOAC (1990). O índice diastásico determinou-se pelo método de SHADE *et al.* (1958), modificado por WITHE *et al.* (1959) e HADORN (1961).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 1. Os valores de hidroximetilfurfural (HMF) obtidos variam entre 1,8 – 15,5 mg/kg de mel, com um teor médio 6,9 mg/kg de mel, encontrando-se todos eles dentro dos limites estabelecidos pela legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003), que fixa um valor máximo de 40 mg/kg de mel.

| Amostra   | H.M.F<br>(mg/kg de mel) | Índice diastásico |
|-----------|-------------------------|-------------------|
| 1         | 1,8                     | 22,9              |
| 2         | 5,9                     | 14,3              |
| 3         | 11,8                    | 3,8               |
| 4         | 3,1                     | 5,8               |
| 5         | 2,5                     | 10,2              |
| 6         | 6,9                     | 13,0              |
| 7         | 5,4                     | 5,1               |
| 8         | 4,4                     | 4,7               |
| 9         | 14,6                    | 26,7              |
| 10        | 6,4                     | 16,1              |
| 11        | 7,2                     | 7,7               |
| 12        | 5,8                     | 19,1              |
| 13        | 2,5                     | 15,7              |
| 14        | 15,5                    | 2,6               |
| 15        | 8,5                     | 16,8              |
| 16        | 8,4                     | 15,2              |
| 17        | 5,1                     | 15,0              |
| 18        | 9,1                     | 17,8              |
| $\bar{X}$ | 6,9                     | 12,9              |
| sd        | 3,9                     | 6,9               |
| Vmin      | 1,8                     | 2,6               |
| Vmax      | 15,5                    | 26,7              |

**Tabela 1** – valores do HMF e índice diastásico

As diversas amostras apresentaram grandes variações dos valores de HMF. Este é um parâmetro importante na qualidade do mel que é influenciado pela temperatura e tempo de armazenamento. Recomendam-se cuidados com o aquecimento do mel a temperaturas nunca superiores a 45°C e o armazenamento a temperaturas estáveis (cerca de 15°C). As variações encontradas devem-se provavelmente às condições de armazenamento por parte dos vários apicultores.

O índice diastásico é um parâmetro utilizado para estudar a evolução da frescura do mel. É usado como parâmetro da qualidade e indicador de envelhecimento. A legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003) estabelece um valor mínimo de 8 para o índice diastásico (na escala de Gothe). Em méis com um conteúdo natural fraco em enzimas, como méis de *Citrus sp.* e de *Eucalyptus sp.* o valor mínimo estabelecido é de 3, sempre que o seu conteúdo em HMF seja inferior a 15 mg/kg de mel. As amostras estudadas apresentam valores que estão compreendidos entre 2,6 – 26,7 (escala de Gothe), com um valor médio de 12,9. Todas as amostras de mel apresentam valores dentro dos limites estabelecidos pela legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003), à exceção da amostra 14, que provavelmente foi submetida a um mau processo de armazenamento, com temperaturas relativamente elevadas.

## REFERÊNCIAS

- Abu-Tarboush, H.M., Al-Kahtani, H.A. e El-Sarrage, M.S. (1993)-Floral-type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chem.* **46**: 13-17.
- Crane, E.-Honey.- A comprehensive survey. 3 ed. London. Heinemann.
- Hadorne, H. (1961).-Zur problematische der quantitative diastasebestimmung in honig. *Mitt. Geb. Lebensm. Unters. Hyg.* **52**: 67-103
- Huidobro, J.F. e Simal, J. (1984)-Parâmetros de calidad de la miel (IV): Hidroximetilfurfural. *Offarm.* **3** (12): 767-781.
- Renner, E. e Duisberg, H. (1938) – Uber den zusammenhang zwischen einigen qualitätsmerkmalen des honigs und dessen naturbelassenheit. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **136**: 137-146.
- Sancho, M.T. (1992) – Aging of honey. *J. Agric. Food Chem.* **40**: pág. 1134-138.
- Shade, J. H., Marsh. G.I. e Eckert. J. E. (1958)-Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Food Res.* **23**: 446-463.
- Winkler, O. (1995) – Beitrag zum nachweis und zur bestimmung von oxymethylfurfural in honig und kunsthoing. *Z. Unters Lebensmit.* **102**: (3) 509-514
- White, J. W. (1978) – Honey. *Adv. Food Res.* **24**: 287-374.



# AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E SENSORIAL DE VARIEDADES REGIONAIS DE POMÓIDEAS

*Andrade, S.<sup>1</sup>; Teixeira, L.<sup>1</sup>; Figueiredo, C.<sup>1</sup>; Guiné, R.<sup>1</sup>; Lopes, A.<sup>2</sup>; Correia, A. C.<sup>1</sup>, Jordão, A.<sup>1</sup>; Ferreira, D.<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>Escola Superior Agrária de Viseu (ISPV), Quinta da Alagoa, Estrada de Nelas, 3500-606 Viseu

<sup>2</sup>Estação Agrária de Viseu (DRABL) – Quinta do Fontelo, 3504-504 Viseu

\*ferdulcineia@esav.ipv.pt

**Palavras-Chave:** maçãs, compostos fenólicos fibra dietética, açúcares.

## **Resumo:**

Os resultados obtidos evidenciam, para determinados parâmetros químicos e/ou nutricionais e de textura, diferenças entre algumas das variedades regionais estudadas. Por comparação com variedades comercializadas verifica-se que as variedades regionais estudadas apresentam valores mais elevados, particularmente do teor em fibra dietética e em compostos fenólicos totais. A análise sensorial efectuada permite inferir a existência de algumas variedades regionais nitidamente mais apreciadas do que outras. Por outro lado, as determinações efectuadas a partir de frutos colhidos em dois anos consecutivos, não revelam variações expressivas para algumas propriedades químicas.

## **1. Introdução**

Este estudo insere-se no âmbito do projecto Agro 740 intitulado “Valorização de variedades regionais de pomóideas através do modo de produção biológico”, que veio dar continuidade a uma linha de trabalho que visa a preservação e valorização de recursos genéticos de variedades de pomóideas do Norte e Centro do País. Este é uma continuação de projectos anteriores que visam a preservação e valorização de recursos genéticos de variedades de pomóideas do Norte e Centro do País. Estas variedades necessitam de caracterização físico-química, de forma a aliar ao processo de caracterização morfológica, a caracterização nutricional e sensorial, permitindo ainda a discriminação das variedades de acordo com as suas propriedades.

Cada vez mais o património alimentar de uma região é de crucial importância para o seu desenvolvimento, principalmente quando os produtos em causa aliam as vantagens de possuir características particulares, porventura mais valorizadas pelo consumidor, às vantagens decorrentes de terem na sua constituição determinados componentes comprovadamente benéficos para a saúde Humana. De entre estes destaca-se o papel fundamental das fibras, e em particular da fibra dietética, e ainda dos compostos fenólicos presentes.

A fibra dietética aumenta a mobilidade intestinal e o conteúdo de humidade das fezes, promovendo um funcionamento saudável do intestino. Além disso na maçã estão presentes compostos bioactivos tais como flavonóides, polifenóis e carotenóides que tornam este fruto um alimento de qualidade superior [1,2]. Os compostos fenólicos presentes na maçã podem ter actividade antioxidante, com benefícios para a saúde, e contribuir para uma dieta alimentar equilibrada. Os flavonóides constituem um grupo de compostos fenólicos bastante abundante em alguns alimentos e tem benefícios comprovados ao nível da prevenção das doenças cardiovasculares, cancro e doenças crónicas [3].

## **2. Materiais e Métodos**

No presente trabalho foram estudadas as seguintes variedades regionais de maçã provenientes da colecção, em produção convencional, existente na Estação Agrária de Viseu (DRABL): Bravo-de-Esmolfe, Camoesa de Alcongota, Durázio, Focinho de Burro, Lila, Malápio da Ponte, Malápio do IFEC, Malápio Fino de Gouveia, Pêro de Coura, Piparote e Pipo de Basto. Para cada tipo de análise química usou-se apenas a polpa da maçã, tendo sido efectuados duplicados. Na análise de textura para cada variedade ensaiaram-se 4 maçãs e efectuaram-se 16 réplicas por fruto, em posições axiais e radiais.

A humidade da polpa foi quantificada recorrendo a uma balança de halogénio (Mettler Toledo HG53). O conteúdo de açúcares totais da polpa foi estimado de acordo com metodologias estabelecidas [4]. O teor de cinzas foi medido por incineração a 550°C seguindo o método da AOAC (1990) [4].

As propriedades de textura foram estudadas pelo método de Análise do Perfil de Textura (TPA) utilizando um texturómetro (modelo TA.XT.PLUS) da Stable Micro Systems.

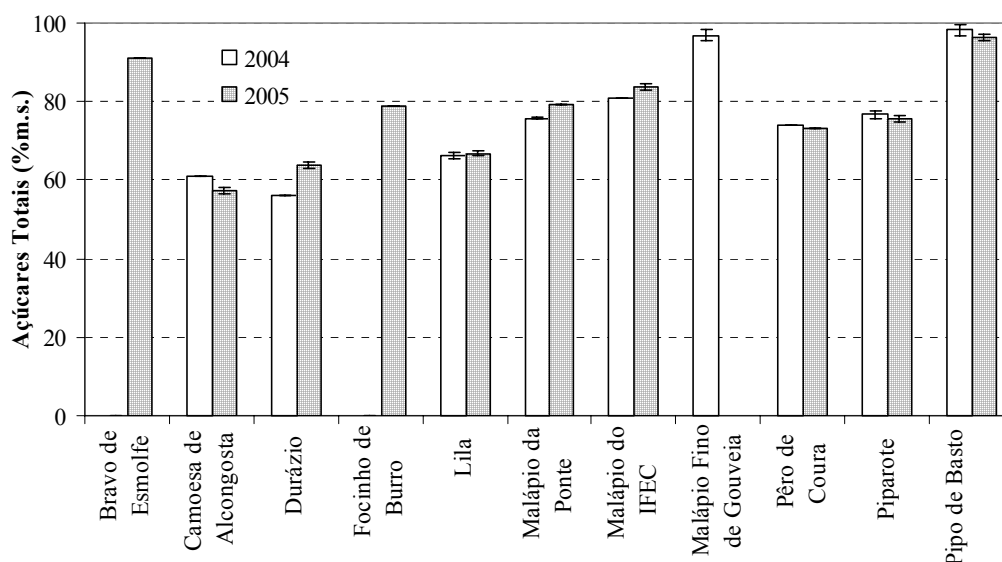
A fibra dietética foi determinada quantitativamente segundo a metodologia descrita por Prosky *et al.* (1988) [5].

No que diz respeito aos teores em polifenóis totais, foi utilizado o método Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Singleton e Rossi (1965) [6]. Os resultados foram expressos em unidades equivalentes de ácido gálico.

A análise sensorial foi realizada por um painel de provadores treinado para o efeito e os parâmetros avaliados foram: a cor, a doçura, a acidez, o aroma, a textura e a apreciação global.

### 3. Resultados e Discussão

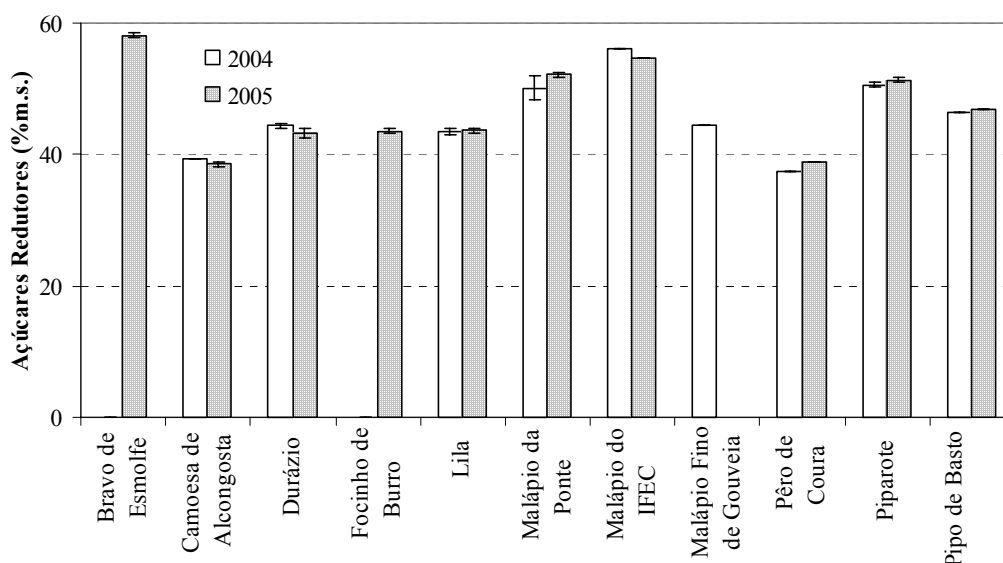
Na Figura 1 apresenta-se um gráfico do conteúdo de açúcares totais de diferentes variedades de maçã, comparando dois anos consecutivos de colheita, 2004 [7] e 2005.



**Figura 1.** Comparação do conteúdo de açúcares totais em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2004 e 2005.

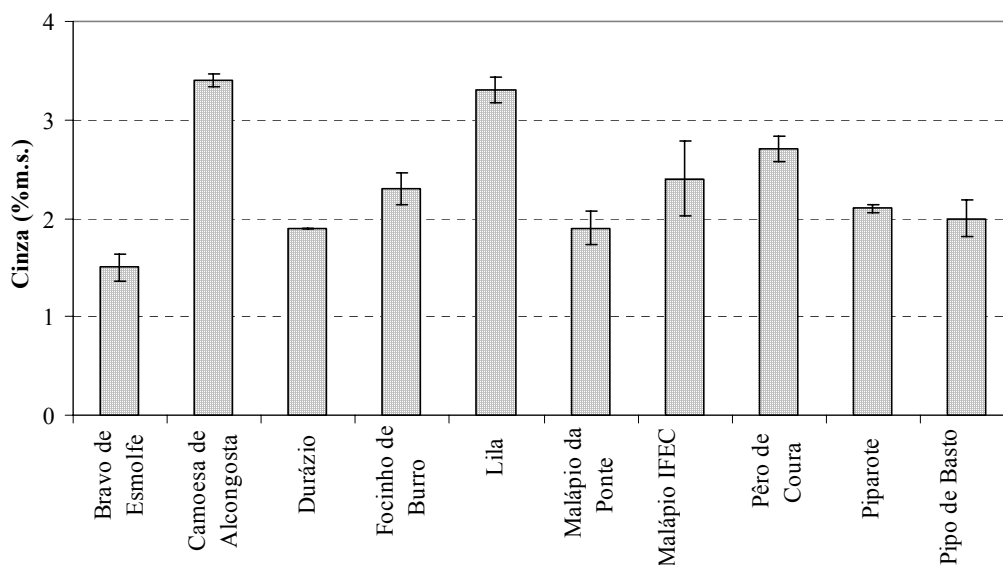
Os resultados apresentados na Figura 1 revelam que o conteúdo de açúcares totais das diferentes variedades de maçã é muito semelhante em dois anos consecutivos de colheita. Verifica-se também pela análise dos valores de açúcares totais que as variedades mais doces são a Bravo de Esmolfe, a Malápio Fino de Gouveia e a Pipo de Basto.

Na Figura 2 apresenta-se um gráfico do conteúdo de açúcares redutores de diferentes variedades de maçã, comparando dois anos consecutivos de colheita, 2004 [7] e 2005. Os resultados apresentados na Figura 1 e 2 permitem inferir que o elevado teor de açúcares da maçã Bravo Esmolfe pode ser atribuído a um elevado teor de açúcares redutores.



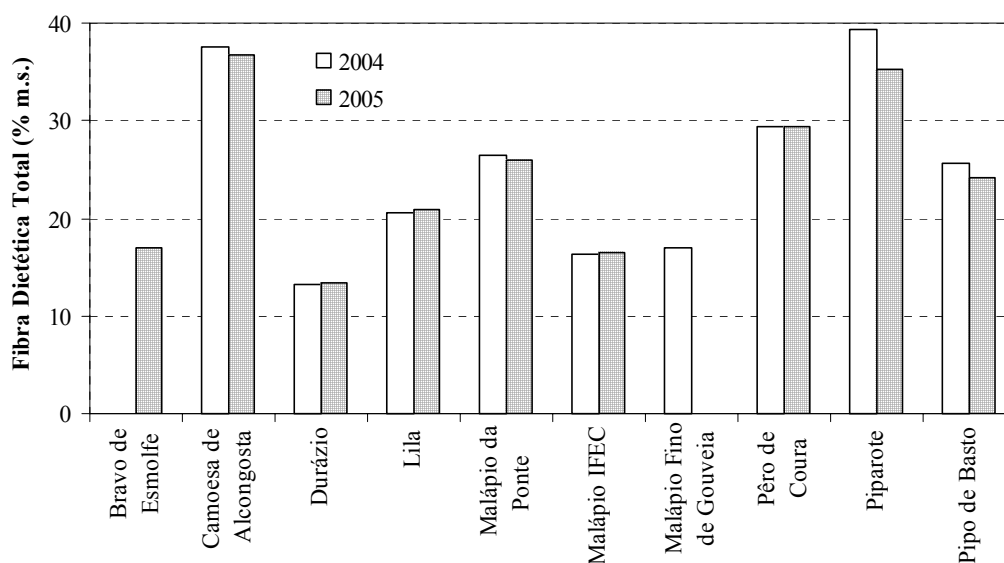
**Figura 2.** Comparação do conteúdo de açúcares redutores em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2004 e 2005.

O teor em cinza das diferentes variedades regionais de maçã é mostrado na Figura 3 para a colheita de 2005. Da análise dos resultados pode inferir-se que a Lila e a Camoesa de Alcongosta são as variedades que se destacam por apresentarem o teor mais elevado de substâncias minerais.



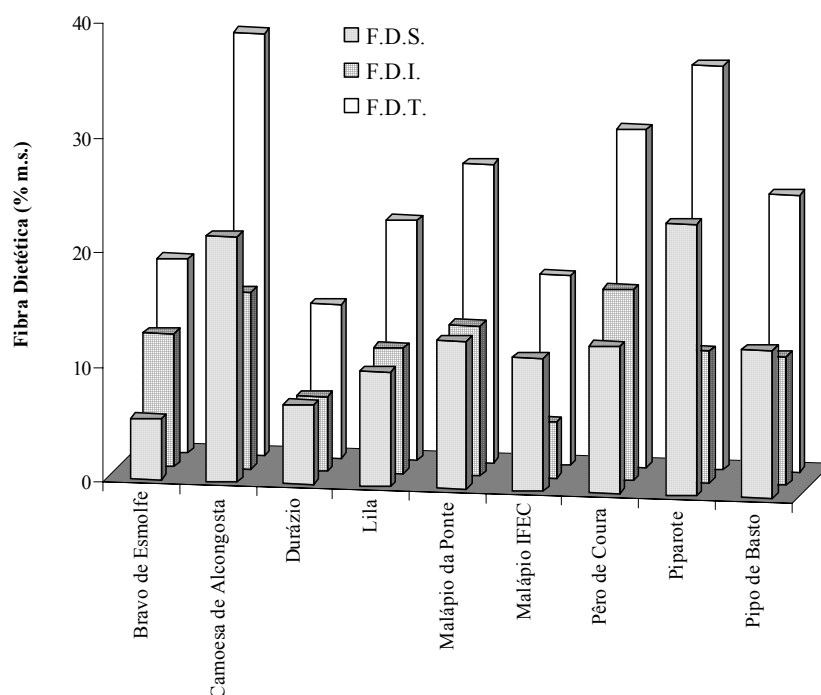
**Figura 3.** Variação do conteúdo de cinza em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2005.

Da análise do gráfico da Figura 4, onde se apresentam os valores do teor de fibra dietética total para as diferentes variedades regionais de maçã colhidas em dois anos consecutivos, 2004 [8] e 2005, verifica-se que estes valores praticamente não variam de ano para ano.



**Figura 4.** Comparação do conteúdo de fibra dietética total em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2004 e 2005.

Os elevados valores de fibra dietética total das variedades Camoesa de Alcongosta e Piparote devem-se a um elevado teor de fibra dietética solúvel em comparação com as restantes variedades, como pode observar-se pelos resultados apresentados na Figura 5.

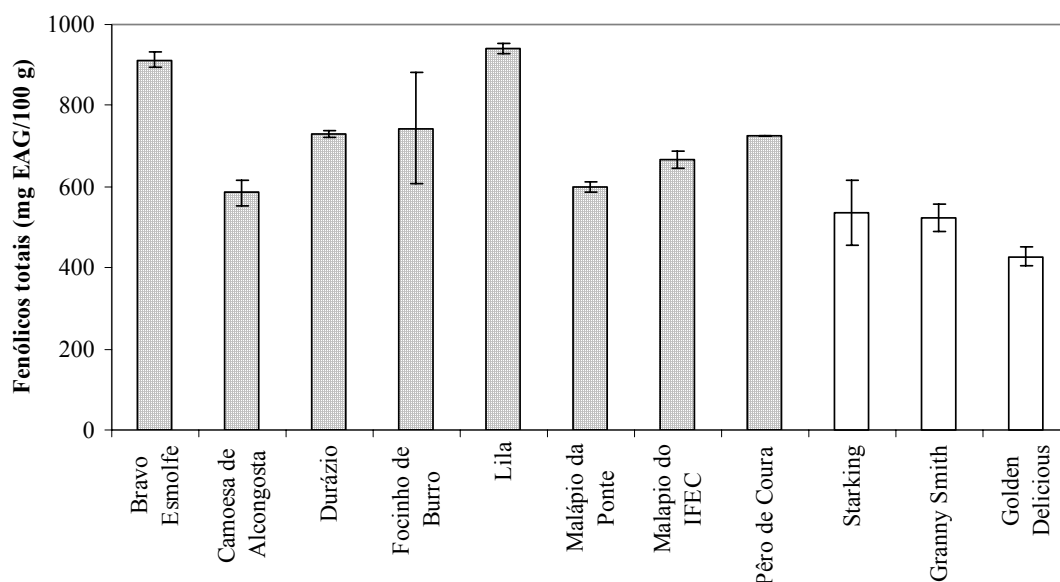


**Figura 5.** Comparação do conteúdo de fibra dietética solúvel, insolúvel e total em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2005.

As variedades analisadas neste trabalho apresentam valores superiores de fibra dietética total em comparação com maçãs de variedade comercializada, designadamente ao nível da fibra dietética solúvel [9]. Relativamente aos cereais, constata-se que as maçãs de variedade regional apresentam uma percentagem superior a estes em fibra dietética solúvel, pelo que as maçãs podem ser

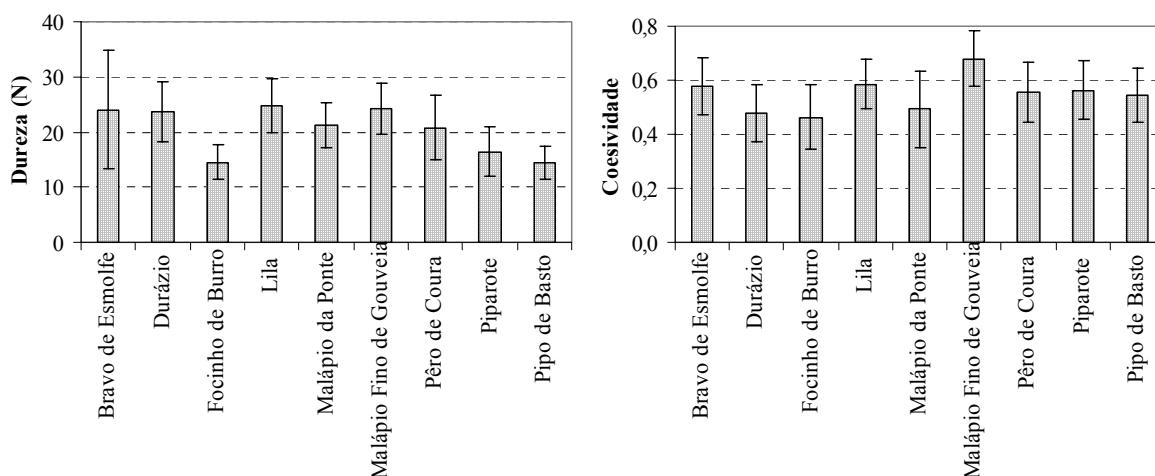


consideradas como um bom substituto dos cereais no que diz respeito à fibra dietética solúvel, uma vez que, os cereais são considerados no geral como a melhor fonte de fibra dietética [9]. Por comparação com variedades de maçã comercializada, tais como a Starking, Golden Delicious e Grany Smith, constata-se pelos resultados apresentados na Figura 6 que grande parte das variedades regionais apresentam valores superiores de compostos fenólicos totais, destacando-se a Bravo de Esmolfe e a Lila com um teor de compostos fenólicos cerca de 80% mais elevado que o determinado em média para as variedades comercializadas.



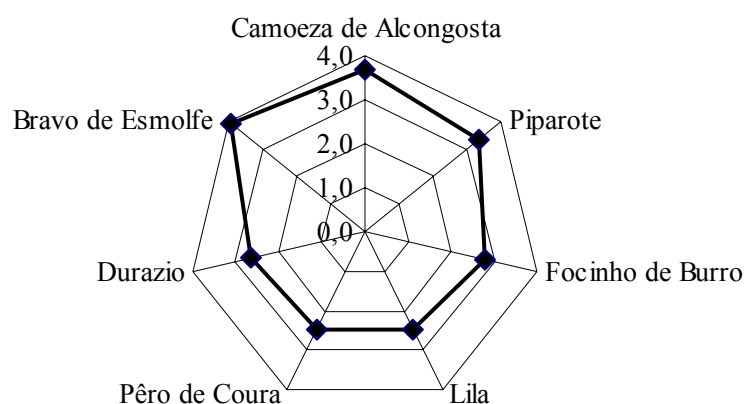
**Figura 6.** Comparação do conteúdo de compostos fenólicos totais em % de matéria seca (m.s.) de variedades regionais de maçã da colheita de 2005.

Os resultados da Figura 7 evidenciam que a variedade que apresenta menor resistência mecânica face à aplicação de uma força de compressão é a Focinho de Burro, denotando-se poucas diferenças entre as restantes variedades. Isto significa que é necessário uma força de intensidade menor para comprimir a polpa na boca entre os molares. Contudo ao nível da coesividade a variedade que apresenta o valor mais elevado é a Malápio Fino de Gouveia. Este resultado pode traduzir-se por uma maior flexibilidade e elasticidade dos tecidos.



**Figura 7.** Parâmetros de textura determinados em modo de compressão de variedades regionais de maçã da colheita de 2005.

Os resultados da análise sensorial relativos à apreciação global (Figura 8) mostram que as maçãs mais apreciadas são a Bravo de Esmolfe e a Camoeza de Alcongosta, em concordância com uma apreciação mais favorável em relação aos atributos aroma e doçura e a uma menor acidez.



**Figura 8.** Apreciação global da análise sensorial de maçãs de variedade regional da colheita de 2005.

### Conclusões

Os resultados obtidos evidenciam que as variedades regionais de maçã estudadas apresentam conteúdos de fibra dietética e de compostos fenólicos superior ao encontrado para certas variedades comercializadas. A análise sensorial efectuada permite inferir que haverá algumas variedades regionais nitidamente mais apreciadas do que outras. Por outro lado, as determinações de dois anos consecutivos revelam valores muito semelhantes para alguns parâmetros químicos.

### Referências

- [1] Sudha M.L., Baskaran V., Leelavanthi K. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chem.*, in press.
- [2] Fernández-Ginéz J.M., Fernández-López J., Sayas-Barberá E., Pérez-Alvarez J.A. (2003). Effects of storage conditions on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fibre. *Journal of Food Science*, 68: 710-715.
- [3] Hagen S.F., Solhaug K.A., Bergtsson G.B., Borge G.I.A., Bilger W. (2006). Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanin and total flavonoids in apples. *Postharvest Biolo. And Tech.*, 41: 156-163.
- [4] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 15th Ed., 1990, Arlington, VA.
- [5] Prosky L., Asp N. G., Schweizer F., DeVRIES W., Furda I. (1988). Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Interlaboratory Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(5): 1017-1023.
- [6] Singleton, V.L. e Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- [7] Fonseca S. (2005). Contribuição para o estudo de propriedades físico-químicas de variedades regionais de maçãs. Escola Superior Agrária de Viseu.
- [8] Soares S. (2005). Estudo de parâmetros nutricionais de maçãs de variedade regional. Escola Superior Agrária de Viseu.
- [9] Li B., Andrews K., Pehrsson P. (2002). Individual Sugars, Soluble and Insoluble Dietary Fiber Contents of 70 High Consumption Foods. *Journal of Food Composition and Análisis*. 15: 715-723.

# CARACTERIZAÇÃO DE NÍVEIS DE MERCÚRIO TOTAL E ORGÂNICO EM PEIXES DE PROFUNDIDADE CAPTURADOS NA COSTA PORTUGUESA

Afonso, C.<sup>1,2(\*)</sup>, Pereira, C.<sup>1</sup>, Ferraria, V.<sup>1</sup>, Lourenço, H. M.<sup>1</sup>, Martins, M. F.<sup>1</sup>, Castro, M.<sup>2</sup>, Nunes, M. L.<sup>1</sup>

(\*)1- Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INRB-IP/IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal. Tel.: +351-21-3027031; fax: +351-21-3015948 e-mail: [cafonso@ipimar.pt](mailto:cafonso@ipimar.pt)  
2-Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa, Portugal

**Palavras-chaves:** Mercúrio total e orgânico, tamboril, peixe espada-preto, areeiro e cantarilho

## Resumo

As espécies de profundidade, tal como o tamboril, cantarilho, peixe espada-preto e areeiro, podem acumular metais tóxicos ao nível dos seus tecidos. Deste modo, o doseamento destes metais, tal como o mercúrio total (Hg) e sua forma orgânica, é de extrema importância. A metodologia utilizada envolveu determinações por espectroscopia de absorção atómica. Os níveis médios de Hg total foram para as espécies de tamboril de  $0,38 \pm 0,36$  mg/kg. Relativamente aos exemplares de cantarilho e peixe espada-preto, a média foi de  $0,68 \pm 0,23$  e de  $0,56 \pm 0,32$  mg/kg, respectivamente. As amostras de areeiro apresentaram um teor médio de  $0,46 \pm 0,25$  mg/kg. É, no entanto, de salientar que alguns dos exemplares analisados, 10% no tamboril e no peixe espada-preto e 90% no cantarilho, revelaram níveis iguais ou superiores aos limites indicados no regulamento da UE. A especiação do mercúrio total nas amostras de músculo das espécies analisadas demonstrou que a maior fracção apresentou-se sobre a forma orgânica (>84%).

## 1-INTRODUÇÃO

Os produtos da pesca desempenham um papel importante não só a nível económico mas também na alimentação humana. Estes, apresentam inúmeros benefícios nutricionais, o que os torna alimentos perfeitos, quando livres de contaminantes, recomendando-se por isso o seu consumo regular. No entanto, podem acumular alguns metais, entre os quais o mercúrio (Hg), por via da cadeia alimentar e afectar desta forma a saúde do consumidor. A especiação dos metais é, sem dúvida, um dos factores de maior importância. No caso do mercúrio, a sua forma orgânica de metilmercúrio é, em termos de toxicidade humana e efeitos adversos para a saúde, a mais importante. Estes efeitos, são ao nível neurotóxico nos adultos e tóxico nos fetos de grávidas expostas a esse composto. A fonte de exposição, na população em geral, é através do consumo de peixe, e o cérebro é, em regra, o órgão mais afectado. Os limites máximos de mercúrio em pescado indicados pela Comissão Europeia são 0,5 e 1 mg/kg conforme a espécie [1]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde [2, 3] a dose semanal admissível estabelecida, a nível internacional, é de 5 µg de mercúrio por quilograma de peso corporal, que inclui, no máximo, 1,6 µg de metilmercúrio por quilograma de peso corporal [4]. Deste modo, os níveis permitidos para um adulto de 70 kg são de 0,35 mg Hg por semana, dos quais 0,11 mg pode provir do metilmercúrio (Beltz & Grosch, 1999). Assim, o objectivo deste trabalho foi determinar níveis de mercúrio total e orgânico em tamboril (*Lophius piscatorius* e *budegassa*), cantarilho (*Helicolenus dactylopterus*), peixe-

espada-preto (*Aphanopus carbo*) e areeiro (*Lepidorhombus whiffiagonis* e *boscii*) que são espécies de enorme interesse sócio-económico em Portugal.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados cerca 10 exemplares de cada espécie (tamboril, cantarilho, peixe espada-preto e areeiro) capturados na costa portuguesa. Após remoção do tecido muscular e sua homogeneização, procedeu-se à liofilização de parte deste tecido. As amostras foram embaladas em vácuo e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

O teor de mercúrio total e orgânico, nas amostras de músculo das referidas espécies, foi determinado por espectrofotometria de absorção atómica. O mercúrio total foi doseado de acordo com o método desenvolvido por Hatch and Ott [5] e descrito em detalhe por Joiris *et al.* [6]. Em relação à determinação do mercúrio orgânico esta foi baseada no descrito por Scerbo & Barghigiani [7].

## 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

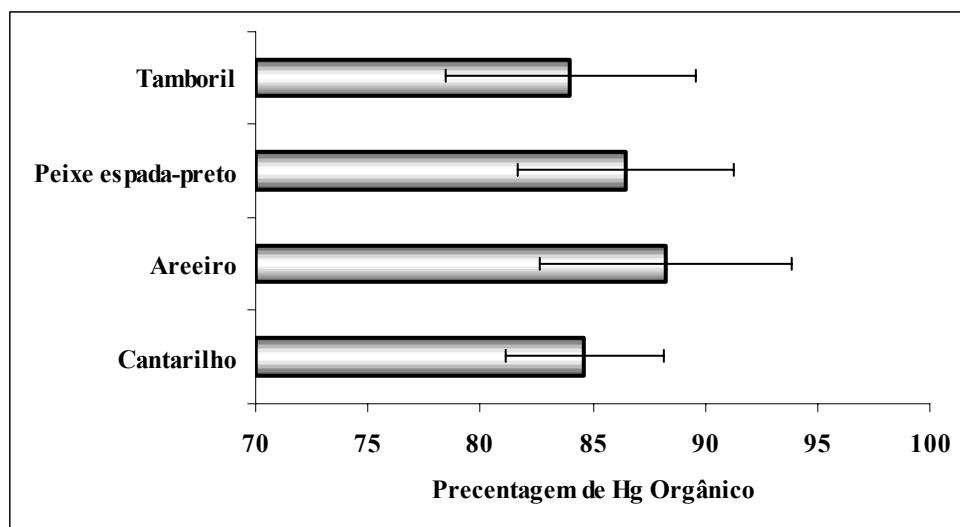
A tabela 1 revela os teores de mercúrio total nas diferentes espécies estudadas. Os níveis médios de Hg total foram para as espécies de tamboril de  $0,38\pm 0,36$  mg/kg. Relativamente aos exemplares de cantarilho e peixe espada-preto, a média foi de  $0,68\pm 0,23$  e de  $0,56\pm 0,32$  mg/kg, respectivamente. Estudos semelhantes [8], revelaram teores médios de mercúrio total inferiores ao obtido para o cantarilho ( $0,29\pm 0,025$  mg/kg) e mais elevados para o peixe espada-preto [9, 10]. As amostras de areeiro apresentaram um teor médio de  $0,46\pm 0,25$  mg/kg. De acordo com o Regulamento da UE [1] o limite máximo de mercúrio total admissível para as espécies estudadas é de 0,5 mg/kg no cantarilho e de 1 mg/kg nas restantes espécies. Os resultados obtidos indicam teores de mercúrio iguais ou superiores ao legislado em cerca de 90% dos cantarilhos analisados. No que respeita ao peixe espada-preto e tamboril esta percentagem cifra-se em 10%. Nenhuma das amostras de areeiro revelou teores acima de 1 mg/kg.

**Tabela 1** – Caracterização das espécies estudadas no que respeita ao teor de mercúrio total (mg/kg peso húmido)

| N=10                | Mercúrio Total (mg/kg peso húmido) |           |                    |           |
|---------------------|------------------------------------|-----------|--------------------|-----------|
|                     | Cantarilho                         | Areeiro   | Peixe espada-preto | Tamboril  |
| <b>Média ± D.p.</b> | 0,68±0,23                          | 0,46±0,25 | 0,56±0,32          | 0,38±0,36 |
| <b>Mediana</b>      | 0,69                               | 0,48      | 0,50               | 0,22      |
| <b>Valor máximo</b> | 0,96                               | 0,77      | 1,28               | 1,20      |
| <b>Valor mínimo</b> | 0,28                               | 0,13      | 0,14               | 0,06      |

D.p. - Desvio padrão

A determinação dos teores de mercúrio orgânico revelou que cerca de 84% do mercúrio total existente no músculo se apresenta sob a forma orgânica (Fig. 1). Percentagens semelhantes foram referidas por diversos autores [8, 10, 11, 12, 13]. O metilmercúrio possui um tempo de residência no músculo relativamente elevado, o que pode explicar os elevados teores encontrados na parte edível de alguns organismos aquáticos [8, 11].



**Figura 1** – Percentagem de mercúrio orgânico nas espécies de profundidade estudadas

### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projecto QCA III – PO MARE “Valorização e Inovação em Produtos da Pesca – 22-05-01- FDR-0006 – Vigilância, Segurança e Qualidade Alimentar”.

### Referências

- [1] – UE - *Regulamento (CE) N.º 1881/2006*. JO L364, 20.12.06 (2006) 5
- [2] – WHO - *Environmental Health Criteria 1: Mercury*, World Health Organization, Genève (1976)
- [3] – WHO - *Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*, World Health Organization, Genève (1990)
- [4] – FAO/WHO – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA (2003)
- [5] – W.R. Hatch, W.L. Ott - *Analyt. Chem.* **40** (1968) 2085
- [6] – C.R. Joiris, L. Holsbeek, J.M. Bouquegneau, M. Bossicart - *Water Air Soil Pollution* **56** (1991) 283
- [7] – R. Scerbo, C. Barghigiani - *Environmental Technology*. 19 (1998) 339-342
- [8] – L.R. Monteiro, E.J. Isidro, H.D. Lopes - *Water, Air, and Pollution* **56** (1991) 359-367
- [9] – C. Afonso, H.M. Lourenço, Abreu Dias, M.L.Nunes, M.Castro – *Food Chemistry* 101 (2007) 120-125
- [10] – A. Renzoni, F. Zino, E. Franchi - *Environmental Research* 77 (1998) 68-72
- [11] – H.U. Riisgård, S. Hansen - *Marine Ecology Progress series* **62** (1990) 259-270
- [12] – J.L. Andersen, M.H. Depledge - *Marine Environmental Research* **44**(3) (1997) 331-350
- [13] – F. Ubillús, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, M.J. Lagarda - *Food Chemistry* **71** (2000) 529-533.

## CARACTERIZAÇÃO POR GC E GC/MS DAS ESPÉCIES *Rimicaris exoculata* E *Mirocaris fortunata*

*Matos*<sup>a,\*</sup>, M.; *Rauter*<sup>a</sup>, A.P.; *Almeida*<sup>b</sup>, A.J.; *Noronha*<sup>c</sup>, J.P.; *Justino*<sup>d</sup>, J.

<sup>a</sup>Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Ed. C8, 5º piso, 1749-016 Lisboa, Portugal. Tel +351 21 7500952 Fax +351 21 7500088 e-mail [mciriaco@netcabo.pt](mailto:mciriaco@netcabo.pt)

<sup>b</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, DBA, Laboratório Marítimo da Guia - IMAR, Estrada do Guincho, 2750-642 Cascais, Portugal. Tel +351 21 4869211 Fax: +351 21 4869720 e-mail [ajalmeida@fc.ul.pt](mailto:ajalmeida@fc.ul.pt)

<sup>c</sup>Departamento de Química, REQUIMTE - CQFB, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal Tel +351 21 2947819 Fax +351 21 294 8550 e-mail [jpn@dq.fct.unl.pt](mailto:jpn@dq.fct.unl.pt)

<sup>d</sup>Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Santarém, Complexo Andaluz, Apartado 279, 2001-904 Santarém, Portugal Tel +351 243 307 300 Fax +351 307 301 e-mail [jorge.justino@ipsantarem.pt](mailto:jorge.justino@ipsantarem.pt)

Utilizando a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), foram estudados os extractos de hexano e de diclorometano dos camarões *Rimicaris exoculata* e *Mirocaris fortunata*, provenientes da fossa dos Açores.

No extracto de diclorometano de *Mirocaris fortunata* foram identificados ácidos gordos (maioritariamente ácido palmítico), ésteres de ácidos gordos, predominantemente palmitato de 2-etil-hexilo e hidrocarbonetos. O estudo de *Rimicaris exoculata* conduziu à detecção do mesmo tipo de compostos, nomeadamente ácidos gordos (também na sua maioria ácido palmítico), ésteres de ácidos gordos (palmitato de etilo predominantemente), hidrocarbonetos (maioritariamente tetratriacontano) e ainda o esteroide colestano-4,6-dien-3β-ol.

No extracto de hexano foram também detectados ácidos gordos em ambas as espécies estudadas, maioritariamente ácido palmítico na espécie *Mirocaris fortunata* e ácido esteárico na espécie *Rimicaris exoculata*, bem como ésteres de ácidos gordos (predominantemente estearato de etilo). Heptadecano foi o hidrocarboneto maioritário detectado no extracto de *Rimicaris exoculata*. Procedeu-se também à derivatização do extracto de hexano com diazometano e *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida para comprovar os compostos identificados.

# CHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORTUGUESE POPULATIONS OF *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Coelho, R.<sup>1</sup>, Faria, M. A.<sup>2</sup>, Barata, A.<sup>3</sup>, Oliveira, MBPP.<sup>2</sup>, Nunes, E.\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIBIO-Laboratório de Genética Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão. Rua Padre Armando Quintas, Vairão, 4485-661 Vila do Conde, enunes@mail.icav.up.pt

<sup>2</sup> REQUIMTE- Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, beatoliv@ff.up.pt

<sup>3</sup> Banco Português de Germoplasma Vegetal, DRAEDM, Quinta de S. José, S. Pedro de Merelim, 4700 Braga, abarata@draedm.min-agricultura.pt

Key words: *Phaseolus vulgaris*, protein, SSR, populations, genetic variability

**Abstract:** The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most consumed legume in the world. In the North and Centre of Portugal this crop contributes to feeding many rural populations, however its biodiversity reduction it's a current and serious problem. Nevertheless, the geographic isolation of some Portuguese populations in Entre Douro e Minho region permitted the safeguard of a large number of populations adapted to our edaphic and climatic conditions. In the present study we analysed 19 Portuguese accessions, experimented in two locals: Vieira do Minho and Braga, collected by the Portuguese Genebank (BPGV).

In order to characterize the referred diversity, chemical (protein content) and molecular (microsatellite DNA) parameters were evaluated for these accessions. The crude protein content was determined using the Kjeldahl method. Significant differences were found among locals, accessions and locals vs accessions interactions. The average crude protein content was higher in Vieira do Minho than in Braga (29.31% and 27.79%, respectively). The molecular characterization was achieved with 6 microsatellite *loci*. It was possible to differentiate most of the accessions using these markers. Notwithstanding all the markers presented polymorphism, some (e.g. BM210) permitted clearly a higher discriminant power. Throughout cluster analysis, the 19 accessions were correlated in terms of genetic proximity and local of origin. The found results can be useful in future improvement programs of common bean.

## 1. INTRODUCTION

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.,  $2n=2x=22$ ) originated from Latin America, occupies the first place in the world-wide production of the legumes, with 19 191 304 T in 2005, and is the primary source of protein available in the developing countries<sup>[1]</sup>. With the objective of preserving the genetic diversity of Portuguese beans, the BPGV (Portuguese Gene bank), initiated its collection in 1981 and established a database of morphological characteristics for utilization by farmers and plant breeders. With the aim to provide additional chemical and molecular information to this collection, 19 accessions were studied in two locations to determine their potential in protein content and their genetic variability.

The dry bean seeds have an average content of 23% of crude protein (17.96% to 27.45%), it is poor in some amino acids like cystine, methionine and tryptophan, but is quite rich in lysine<sup>[2-5]</sup>.

The Kjeldahl method is the most frequently used technique for determination of organic nitrogen in food products. The method consists of 3 steps: (i) digestion - decomposition of nitrogen by heating with concentrated sulphuric acid being the result an ammonium sulphate solution; (ii) distillation – addition of excess base to the acid digestion mixture to convert  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NH}_3$ , following by boiling and condensation of the gas in a receiving solution; and

(iii) titration – quantification of  $\text{NH}_3$  in the receiving solution, by titration with a colorimetric endpoint detection <sup>[6]</sup>.

Among the molecular markers available, the microsatellites have several advantages over others previously experimented. Microsatellites are short tandem repeats of DNA (2-10 bp), generally distributed throughout the genome of an organism. The microsatellites constitute an important source of genetic variability and are abundant in the plant genome. Microsatellite markers have been developed for common bean <sup>[7-8]</sup>, used to construct a PCR-based genetic map <sup>[9]</sup>, to identify genetic variability <sup>[10-11]</sup> and to develop multiplex SSR-PCR in common bean <sup>[12]</sup>.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Nineteen Portuguese accessions of common bean were collected by BPGV in three regions (Viana do Castelo, Vila Real and Braga) and experimented in Vieira do Minho and Braga. Beans were sown in the greenhouse (09-04-2003) and transferred to the field in Braga (12-05-2003) and Vieira do Minho (14-05-2003). Five characteristics were observed: days to flowering (DF), plant height (PH), days to harvest (DH), weight of seeds per plant (SW), and 100 seeds weight (HSW).

Ten seeds from each location were ground to powder and the proximate protein composition was determined based on a Kjeldahl method <sup>[13]</sup>. The crude protein was analyzed using Kjeldahl block digestion (Büchi) and distillation unit (Büchi 321- distillation unit). The conversion factor used to convert nitrogen to crude protein was 6.25.

Genomic DNA was extracted from plantlets of three seed of each accession. The extraction was based in CTAB extraction buffer protocol <sup>[14]</sup>. Six microsatellite loci were analyzed: GATS91, BM53, BM143, BM188, BM199 and BM210 <sup>[8]</sup>. PCR amplifications were performed in a Biometra T3000 thermal cycle (Goettingen, Germany) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  containing 20 ng of DNA template, 2 pmol of each of the forward and reverse primers, 250  $\mu\text{M}$  of total dNTP, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1 unit of Taq DNA polymerase). Amplification protocols followed the profile of temperatures: 94°C for initial denaturation set of 2 minutes, 35 cycles of 94°C during 1 minute, an annealing temperature between 53°C to 58°C (depending of primers pair) during 1 minute, an extension at 72°C during 2 minutes and a final extension at 72°C during 5 minutes. Band visualisation was performed using PAGE.

Analysis of variance (ANOVA), Duncan's multiple range ( $\alpha=0.05$ ) and Pearson Correlation Coefficients included in SAS (2006) were used to analyze crude protein and morphological characteristics data. Cluster analysis was used to classify accessions from germplasm according to their degree of genetic similarity, based on the Unweighted pair-group average method, performed by using the software STAT (2006).

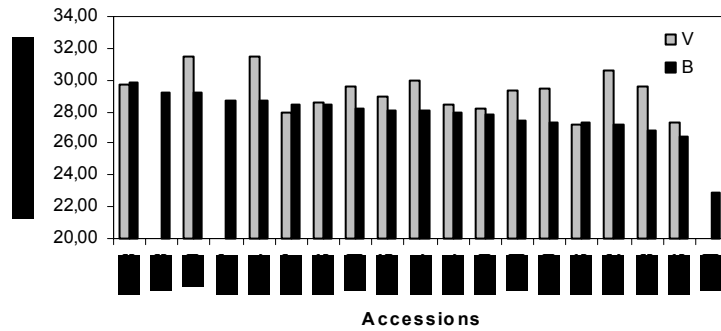
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

There were significant differences ( $p<0.05$ ) for crude protein among Local, Accessions, and Accession x Local interaction. Average crude protein content was higher in Vieira do Minho (29.31 %) than in Braga (27.79 %). The accessions 1310, 7544 and 6538 presented higher crude protein content (30.30 %, 30.06 % and 29.80 %, respectively), and 5776, 5766 and 6561 presented lower values (27.22 %, 26.91 % and 22.96 %, respectively). Accessions produced higher crude protein content in Vieira do Minho than in Braga, except the accessions 6538, 6677, 8056 and 5776 (Figure 1). The length of growing season favors plant growth: taller plants produced higher seed weight with higher crude protein content than shorter plants. In Vieira do Minho the growing season was 7 days larger than in Braga, plants



were 17 cm taller than in Braga, seeds per plant were 21,5g heavier than in Braga, and had 1,52% more crude protein than in Braga .

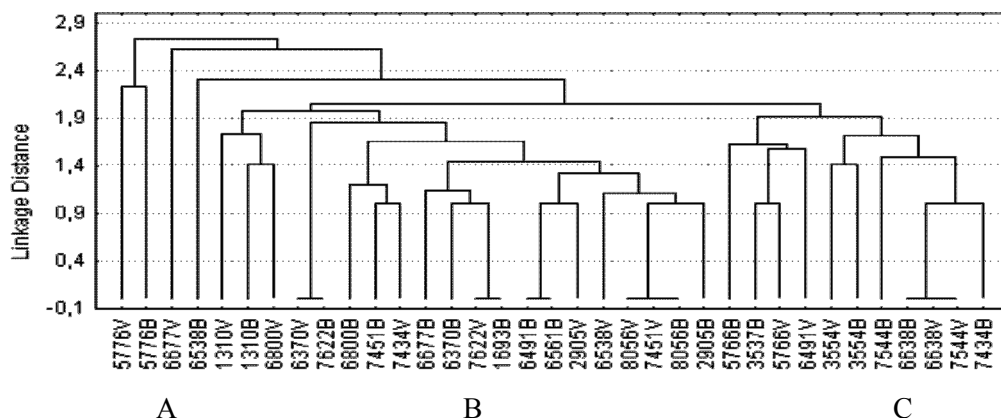
The found differences in crude protein content among locals, could be explained by differences in altitude, PET (Potential Evapotranspiration) and soil type between these locals. These conditions extended the growing season in Vieira do Minho with 7 additional days, which favour plant growth, seed weight, and crude protein content.



**Figure 1** - Comparison of crude protein content on the 19 accessions between Vieira do Minho (V) and Braga (B).

An average of 4.7 alleles was identified per microsatellite *locus* across all accessions. The average number of alleles per accession ranged from 1.3 to 2.2. The most polymorphic locus was BM210 and the least BM199.

The accessions were grouped into three major clusters, A, B and C. Clusters B and C were more similar than cluster A. In cluster B, the accessions 6370V and 7622B had the same genetic distance, as well as the accessions 7622V and 1693B, 6491B and 6561B, and 8056V, 8056B and 7451V. In cluster C, the accessions 6638B, 6638V and 7544V had the same genetic distance. Due to the importance of honeybee production in the region, the genetic variability found in the same accessions on the two places, may be attributed to the bees' activity.



**Figure 2** - Dendrogram showing the genetic relationships among 19 accessions using SSR. The letters A, B, and C corresponds to the 3 clusters obtained.

### 3. CONCLUSIONS

A more detailed experiment is necessary to find out the effect of the environmental conditions of Vieira do Minho on crude protein content, namely soil chemical analysis, the relationship between *rhizobium* of the accessions and protein content, as well as, the utilization of a greater number of microsatellites for a more complete evaluation of the populations in study.

#### References

- [1]-Gepts, P. - *Phaseolus vulgaris* (Beans). Academy Press (2001)
- [2]-Antunes, P.L., Bilhalva, A., B.; Elias, M. C. and Soares, G. J. D. - Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares Rico23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. Rev.Brás. de Agrociência, V.1, Nº1, (1995) 12-18
- [3]-Andrade, C. A. B.; Patroni, S. M. S.; Clemente, E.; Scapin, C. A.; Silvério, L. - Effect of fertilization in protein and tryptophan contents in three bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*L.). Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. East Lansing, U.S.A. v. 46 (2003) 93-94.
- [4]-Stoilova, T., Pereira, G., Sousa, M.M.T. and Carnide, V. - Diversity in common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) from Bulgaria and Portugal. Journal Central European Agriculture. V.6 n.4 (2005) 443-448.
- [5]-Pujolá, M., Farreras, A., Casañas, F. - Protein and starch content f raw and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chem,doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.039.(2006)
- [6]-Camp, J. V, Huyghebaert, A. - Nutrient Analysis. 9. Proteins in Food. Handbook of Food Analysis. Volume I – Physical Characterization and Nutrient Analysis. Ed. Leo M. L. Mollet. (1996) 1088: 282-288
- [7]-Yu, K., Park, S. J., Poysa, V., and Gepts, P. - Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The American Genetic Association 91(2000):429-434.
- [8]-Gaitán-Solís, E., Duque, M.C., Edwards, K. J., and Thome, J. - Microsatellite Repeats in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, Characterization, and Cross-Species Amplification in *Phaseolus* ssp.Crop Sci 42 (2002): 2128-2136.
- [9]-Blair, M. W., Giraldo M. C., Buendía, H. F., Tovar, E., Duque, M. C., Beebe, S. E.- Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet, 113 (2006):100-109
- [10]-Gómez, O. J., Blair, M. W., Frankow-Lindberg, B. E. and Gullberg, U. - Comparative study of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces conserved ex situ in genebanks and in situ by farmers. Genetic Resources and Crop Evolution, 52 (2005): 371-380.
- [11]-Blair, M. W., Pedraza, F., Buendia, H. F., Gaitán-Sólis, E., Beebe, S. E., Gepts, P., Tohme, J. - Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 107 (2003):1362-1374.
- [12]-Masi, P., Zeuli, P. L. S. and Donini, P. - Development and analysis of multiplex microsatellite markers set in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Molecular Breeding 11 (2003): 303-313
- [13]- Dr. William Horwitz (ed.) - Official Methods of Analysis of AOAC International.. 17<sup>th</sup> Edition. AOAC International, Gaithersburg, USA (2000)
- [14]-Doyle, J. J., Doyle, J. L.- Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus,12 (1990): 13-15

# COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PRODUZIDOS POR DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS NA FERMENTAÇÃO DO SORGO

Correia, I.; Nunes, A.; Barros, A. e Delgadillo, I.

Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro

Tel +351-234 370 719 Fax +351 234 370 084 email: [acorreia@dq.ua.pt](mailto:acorreia@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** sorgo, fermentação láctica, qualidade nutricional.

**Resumo:** Amostras de farinha de sorgo foram fermentadas com diferentes estirpes de bactérias lácticas e com grãos de kefir, e analisadas quanto ao seu teor em aminoácidos, proteína solúvel, proteína total, açúcares redutores, açúcares totais e amido. Os resultados revelam que, à semelhança da fermentação tradicional, há uma melhoria da qualidade nutricional das papas de sorgo fermentadas com as referidas espécies. Concluiu-se que os inóculos mais efectivos são a *L. brevis* e *S. thermophilus* e a flora presente nos grãos de kefir. Este trabalho mostra que estes inóculos podem ser aplicados na preparação de um produto de sorgo nutricionalmente enriquecido e mais seguro em termos alimentares.

## 1. INTRODUÇÃO

O sorgo é a principal fonte de nutrientes para as populações subdesenvolvidas da África e Ásia. Contudo, apresenta uma reduzida qualidade nutricional, sobretudo quando submetido ao cozimento. Este facto está relacionado com o elevado grau de subnutrição nas zonas onde este cereal é consumido.

A fermentação fornece um contributo importante na preparação destes alimentos porque é uma tecnologia barata que permite preservá-los, aumentar o seu valor nutricional e melhorar as características sensoriais [1]. Assume ainda uma importância cultural, sendo uma arte tradicional que se mantém ao longo de séculos.

Tradicionalmente, os produtos fermentados à base de sorgo são preparados por mistura de água e farinha para a obtenção de uma pasta que é fermentada à temperatura ambiente durante um ou dois dias e que serve de inóculo para uma fermentação posterior. Como a fermentação é realizada a nível artesanal, diferentes processos podem ser utilizados e, conseqüentemente, podem ocorrer diferentes tipos de microrganismos nestas fermentações.

A segurança dos produtos fermentados tem sido objecto de estudo, tendo-se verificado a ocorrência de infecções e intoxicações provocadas por metabolitos microbianos produzidos durante a fermentação. Os principais factores de risco incluem a utilização de matérias-primas contaminadas, a ausência de pasteurização e condições de fermentação pouco controladas. Torna-se assim importante o estudo de técnicas de fermentação que utilizem culturas conhecidas de microrganismos, seguras em termos alimentares, que permitam uma melhoria das características nutricionais do sorgo [2].

Para tal, foram testados diferentes espécies de bactérias lácticas e a flora presente em grãos de kefir.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As estirpes microbianas *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus thermophilus* foram adquiridas na empresa DSMZ.

Foram preparadas suspensões de cada um dos microorganismos em fase exponencial de crescimento. As suspensões foram preparadas de modo a apresentarem concentrações celulares iguais em soro fisiológico (densidade óptica de 0,5 para 600 nm).

Grãos de sorgo da variedade Jumbo (adquiridos no mercado tradicional) foram moídos num moinho de café e peneirados para obtenção de uma farinha com granulometria inferior a 400 µm. A farinha resultante foi misturada com água (proporção 1:10 (m/v)) para obtenção de amostras de consistência semelhante à dos produtos tradicionais.

Depois de esterilizadas, cada uma das seis amostras foi fermentada com uma das referidas espécies bacterianas de acordo com o descrito por Correia *et al.* [3].

Para efeitos comparativos, uma outra amostra foi preparada e fermentada, sem esterilização prévia, de acordo com o processo tradicional. Para tal, foi utilizada como cultura propagadora (*starter*) da fermentação uma farinha de sorgo comercial proveniente da África do Sul (King Korn Mabele – King Food Corporation), [3].

Ao mesmo tempo foram testados grãos de kefir usados na produção caseira da bebida. Aproximadamente 5 g de grãos de kefir foram adicionados a outra amostra e incubados à temperatura ambiente. A fermentação foi interrompida ao fim de 3 dias, tempo necessário para que se verificasse uma descida no valor do pH para aproximadamente 3,5.

Paralelamente, foi preparada uma farinha de sorgo não fermentada (testemunha), em que os procedimentos foram efectuados de igual forma omitindo-se, apenas, a inoculação com bactérias.

Depois de fermentadas, o pH das amostras foi determinado e, posteriormente, uma alíquota de cada foi congelada e liofilizada para futuras análises da farinha inteira. Uma outra alíquota foi centrifugada, sendo os sobrenadantes congelados para análise dos constituintes solúveis.

## 2.2- ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras de farinha inteira foram analisadas quanto ao seu teor em proteína total e em amido. Os sobrenadantes das amostras foram analisados quanto ao teor em açúcares totais, açúcares redutores, aminoácidos livres e proteína solúvel. As análises foram realizadas com recurso aos métodos descritos em Correia *et al.* [3].

## 3. RESULTADOS

Na tabela 1 estão indicados os resultados das amostras fermentadas com as diferentes espécies de bactérias lácticas isoladas.

Verifica-se com a fermentação uma diminuição do pH em todas as amostras, este facto é sustentado por estudos anteriores, que revelaram que a formação de ácido láctico e de outros ácidos como o acético, o fórmico e o succínico estão na base do aumento da acidez [3].

Ocorre uma diminuição no teor de açúcares redutores e totais para quase todas as amostras. Este decréscimo deve-se ao facto dos microrganismos estarem a utilizar os açúcares disponíveis, obtidos pela solubilização de parte do amido (como consequência da gelatinização promovida pela fervura/autoclavagem), e pelo ataque enzimático ao amido como fonte de energia. Outros estudos publicados confirmam a diminuição nos açúcares redutores [4] e nos açúcares totais [5]. Por outro lado, e no caso das espécies *L. Brevis* e *S. Thermophilus* e da flora endógena, verifica-se um aumento nos açúcares. Este facto indica que as espécies são bastante amilolíticas e que provavelmente clivam mais o amido do que consomem. O aumento do teor em aminoácidos livres pode ser resultante da hidrólise das proteínas por proteases e peptidases microbianas [6]. Os aminoácidos podem ainda ser produzidos pelo metabolismo dos microrganismos durante o seu crescimento. Quando a

produção de aminoácidos é superior às necessidades de consumo, verifica-se aumento no seu teor. Esse aumento observa-se no caso das amostras inoculadas com *L. Brevis* e *S. Thermophilus*, indicando que para além de amilolíticas essas espécies são também proteolíticas. O facto de haver um aumento de proteína solúvel para essas amostras e para a fermentada tradicionalmente, revela que clivam proteína do resíduo que passa para a fase aquosa na forma de proteínas solúveis e aminoácidos. No caso da amostra tradicional essa clivagem é acompanhada de um elevado consumo que faz diminuir o teor em aminoácidos. Nas amostras fermentadas com *L. Plantarum*, *L. fermentum* e *P. Pentosaceus* ocorre uma diminuição tanto na proteína solúvel como no teor de aminoácidos, o que revela que essas espécies são grandes consumidoras de peptídeos e aminoácidos, não apresentando no entanto grande actividade proteolítica.

O teor em proteína total e em amido, contudo, não difere significativamente para nenhuma amostra, à excepção do *L. brevis*, para a qual o amido diminui drasticamente. Este facto sugere uma diminuição de ambos os componentes da farinha que se auto-mascaram.

**Tabela 1:** Valores de pH, aminoácidos e proteína solúvel, proteína total, açúcares redutores e açúcares totais da testemunha e das amostras fermentadas com bactérias lácticas e com a flora endógena.

| Amostras               | pH  | Aminoácidos Solúveis (mg/L)  | Proteína Solúvel (mg/L)       | Proteína Total (%) | Açúcares Redutores (mg/L)      | Açúcares Totais (mg/L)           | Amido (%)                  |
|------------------------|-----|------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Testemunha             | 6,4 | 167,2<br>± 8,7               | 1218,4<br>± 45,4              | 9,1<br>± 0,2       | 697,5<br>± 27,9                | 1767,9<br>± 89,9                 | 65,9<br>± 2,1              |
| <i>L. Plantarum</i>    | 4,1 | 159,8<br>± 8,4               | 759,9 <sup>a</sup><br>± 138,5 | 9,5<br>± 0,2       | 156,1 <sup>a</sup><br>± 17,5   | 986,1 <sup>a</sup><br>± 79,9     | 65,7<br>± 2,1              |
| <i>L. Brevis</i>       | 3,9 | 385,6 <sup>a</sup><br>± 7,3  | 1316,5 <sup>a</sup><br>± 16,6 | 9,4<br>± 0,9       | 2175,69 <sup>a</sup><br>± 4,2  | 18089,7 <sup>a</sup><br>± 2110,5 | 41,7 <sup>a</sup><br>± 1,8 |
| <i>L. Paracasei</i>    | 3,9 | 278,2 <sup>a</sup><br>± 14,3 | 835,1 <sup>a</sup><br>± 133,8 | 10,7<br>± 1,5      | 234,11 <sup>a</sup><br>± 5,9   | 1593,2 <sup>a</sup><br>± 72,8    | 72,0<br>± 1,1              |
| <i>L. Fermentum</i>    | 4,6 | 161,5<br>± 4,8               | 792,8 <sup>a</sup><br>± 24,9  | 9,4<br>± 0,6       | 167,1 <sup>a</sup><br>± 6,8    | 889,6 <sup>a</sup><br>± 31,7     | 72,1<br>± 1,5              |
| <i>P. Pentosaceus</i>  | 5,1 | 135,9 <sup>a</sup><br>± 9,2  | 789,1 <sup>a</sup><br>± 72,3  | 9,6<br>± 0,4       | 245,1 <sup>a</sup><br>± 6,0    | 1384,3 <sup>a</sup><br>± 99,9    | 69,6<br>± 2,6              |
| <i>S. Thermophilus</i> | 4,3 | 346,6 <sup>a</sup><br>± 12,9 | 1514,5 <sup>a</sup><br>± 39,7 | 9,4<br>± 0,1       | 668,9 <sup>a</sup><br>± 10,2   | 2507,3 <sup>a</sup><br>± 178,5   | 67,9<br>± 1,9              |
| Flora endógena         | 3,4 | 124,3 <sup>a</sup><br>± 9,1  | 1711,8 <sup>a</sup><br>± 30,6 | 11,6<br>± 0,2      | 3128,9 <sup>a</sup><br>± 109,1 | 13704,8 <sup>a</sup><br>± 5,7    | 69,1<br>± 2,5              |

NT: Média de três réplicas.

<sup>a</sup> Diferenças em relação à amostra não processada (testemunha) consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos com a flora do kefir, verificando-se uma diminuição do pH, mais uma vez indicativa da produção de ácidos orgânicos.

Observa-se ainda um aumento nos açúcares totais e redutores solúveis e uma diminuição drástica de amido. Este facto indica que este inóculo cliva praticamente todo o amido,

aumentando o teor de açúcares no sobrenadante. Essa solubilização ocorre a uma taxa superior às necessidades de consumo de hidratos de carbono por parte dos microrganismos. Por outro lado, verifica-se também uma extensa actividade proteolítica, uma vez que ocorre um aumento acentuado em proteína solúvel. A diminuição no teor de aminoácidos livres significa que as espécies presentes estão a utilizá-los durante o seu crescimento.

**Tabela 2:** Determinação do pH, aminoácidos e proteína solúvel, açúcares redutores e açúcares totais da testemunha e da amostra fermentada com grãos de kefir.

| Amostras       | pH  | Aminoácidos Solúveis (mg/L) | Proteína Solúvel (mg/L)        | Açúcares Redutores (mg/L)      | Açúcares Totais (mg/L)        | Amido (%)                 |
|----------------|-----|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Testemunha     | 6,4 | 167,2<br>± 8,7              | 1218,4<br>± 45,4               | 697,5<br>± 27,9                | 1767,9<br>± 89,9              | 65.9<br>± 2,1             |
| Grãos de kefir | 3,6 | 115,8 <sup>a</sup><br>±1,9  | 38350.7 <sup>a</sup><br>±164,6 | 22772.2 <sup>a</sup><br>±350,1 | 42776.2 <sup>a</sup><br>± 2,7 | 2.4 <sup>a</sup><br>± 0,0 |

NT: Média de três réplicas.

<sup>a</sup> Diferenças em relação à amostra não processada consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

#### 4- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que, entre os vários inóculos simples utilizados, as espécies *L. brevis* e *Streptococcus thermophilus* são as mais eficientes na fermentação do sorgo, apresentando resultados comparáveis aos da fermentação tradicional.

Tanto as referidas espécies puras como a flora presente nos grãos de kefir promovem um incremento na qualidade nutricional da farinha de sorgo, pela clivagem dos seus biopolímeros em compostos mais simples e mais facilmente metabolizados pelo organismo humano. Estes inóculos apresentam uma extensa actividade proteolítica e amilolítica no sorgo, o que se traduz numa melhoria da digestibilidade da proteína e do amido. No caso da flora dos grãos de kefir, os efeitos são mais acentuados, o que poderá estar relacionado com o facto de ser uma cultura mista composta por bactérias lácticas e leveduras.

Os resultados sugerem que as espécies *L. brevis* e *Streptococcus thermophilus* e os grãos de kefir podem ser aplicados na preparação de produtos de sorgo nutricionalmente enriquecidos e mais seguros em termos alimentares. A forma de processamento sugerida neste trabalho possui aplicabilidade a nível industrial, sendo sensível às limitações económicas e tecnológicas dos países consumidores de sorgo.

#### Referências

- [1] K. H. Steinkraus (ed.) - *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York (1995)
- [2] M. J. R. Nout - *Food Res. Int.* **27** (1994) 291.
- [3] I. Correia, A. Nunes, I. F. Duarte, A. Barros, I. Delgadillo - *Food Chem.* **90** (2005) 853-859.
- [4] J. K. Mugula - *Plant Foods Human Nutr.* **42**:3 (1992) 247-256.
- [5] A. H. El Tinay, A. M. Abdel Gadir, M. El Hidai - *J. Sci. Food Agri.* **30** (1979) 859-863.
- [6] P. M. Au, M. L. Fields - *J. Food Sci.* **46**:2 (1981) 652-654.

Isabel Correia agradece à FCT a bolsa de doutoramento ref. nº SFRH / BD / 19525 / 2004.

# COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO, CÁDMIO E CHUMBO EM ESPÉCIES DE AQUICULTURA E SELVAGENS

Lourenço<sup>1,2\*</sup>, H.M.; Afonso<sup>1</sup>, C.; Anacleto<sup>1</sup>, P.; Pereira<sup>1</sup>, C.; Martins<sup>1</sup>, M.F.; Nunes<sup>1</sup>, M.L.; Lino<sup>2</sup>, A.R.

1. Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INRB-IP/IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

Tel.: +351-21-3027031; fax: +351-21-3015948; [helena@ipimar.pt](mailto:helena@ipimar.pt)

2. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, Edifício C8, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

**Palavras-chave:** dourada, robalo, truta, contaminantes metálicos, aquicultura

**Resumo:** De entre as espécies que apresentam grande potencial na aquicultura destacam-se a dourada, robalo e truta cujas produções integram as recomendações constantes nos códigos de boas práticas de uma aquicultura responsável. Foi objectivo deste trabalho determinar e comparar nestas três espécies, provenientes da pesca e de diferentes unidades de aquicultura nacionais, os níveis de vários metais pesados por absorção atómica. Os teores de mercúrio foram quase sempre inferiores ao limite máximo indicado pela UE (0,5 mg/kg de peso húmido), à excepção de algumas amostras de dourada selvagem que ultrapassaram esse limite. Relativamente ao chumbo e cádmio os níveis encontrados foram sempre muito inferiores aos limites propostos pela UE (0,2 mg/kg e 0,05 mg/kg, respectivamente) o que indica uma baixa contaminação por parte destes dois metais.

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma alternativa importante relativamente aos stocks de peixe em habitat selvagem, todavia, em Portugal, os peixes de aquicultura ainda são uma pequena parte quando comparados com as pescas [1]. De acordo com a FAO, no ano de 2030 a aquicultura dominará o mercado e provavelmente apenas metade dos produtos da pesca consumidos serão provenientes da actividade pesqueira tradicional [2]. De entre as espécies de aquicultura mais importantes na UE podem destacar-se a dourada (*Sparus aurata* Linnaeus 1758), robalo (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus 1758) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). As produções destas espécies têm crescido nos últimos anos sendo geralmente comercializadas inteiras, em fresco [3].

Apesar de os produtos da pesca e aquicultura serem considerados um alimento indispensável numa dieta equilibrada, podem acumular nos seus tecidos certos compostos químicos, nomeadamente, metais considerados tóxicos, como mercúrio, chumbo e cádmio. Actualmente existem limites para estes três metais, definidos por regulamentação da União Europeia [4]. Assim, foi objectivo deste trabalho avaliar e comparar os níveis de mercúrio, chumbo e cádmio em dourada, robalo e truta de aquiculturas portuguesas desde 2002 e capturados no Oceano Atlântico e em rio, no ano de 2005.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de dourada, robalo e truta arco-íris foram colhidas em várias aquiculturas localizadas em Portugal e capturadas no Oceano Atlântico, ao largo de Peniche, à excepção da truta selvagem que foi pescada na Lagoa do Rosinho (Serra da Estrela). Após a colheita, todos os peixes foram congelados e armazenados a  $-21^{\circ}\text{C}$  até chegada ao laboratório. Assim

que possível, foram descongelados e processados. De cada peixe foi recolhida a parte edível e homogenizada. As amostras homogenizadas foram depois colocadas em sacos de plástico, individualmente, selados a vácuo, codificados para identificação fácil e armazenados a  $-25^{\circ}\text{C}$  até análise posterior dos metais.

O mercúrio total (Hg) foi determinado por absorção atómica em fase de vapor frio (CVAAS) usando um analisador de mercúrio Bacharach Coleman MAS-50D. O método utilizado foi o desenvolvido por Hatch and Ott [5] e descrito em detalhe por Joiris *et al.* [6]. A determinação de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foi efectuada por absorção atómica de chama num aparelho Varian SpectrAA 55B, de acordo com Jorhem [7]. Todas as análises foram realizadas em duplicado, usando o método de calibração externa. A exactidão de cada método foi testada utilizando materiais de referência certificados (CRM 463 e CRM 422) do BCR (Bureau Communautaire de Référence). Os valores obtidos estavam de acordo com os valores certificados. Os limites de detecção (calculados pelo desvio padrão residual da regressão linear) são:  $0,01\text{ mg kg}^{-1}$  para Hg,  $0,05\text{ mg kg}^{-1}$  para Pb e  $0,01\text{ mg kg}^{-1}$  para Cd. Os teores são expressos em  $\text{mg kg}^{-1}$  (base húmida).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se na tabela 1.

Os teores de mercúrio para todas as espécies de aquicultura estudadas foram sempre inferiores ao limite máximo indicado pela UE ( $0,5\text{ mg kg}^{-1}$ ). A média mais elevada foi encontrada nas amostras de robalo,  $0,12\text{ mg kg}^{-1}$ , sendo este valor cerca de 5 vezes inferior ao limite proposto. Os níveis registados para os peixes selvagens foram idênticos à excepção de algumas amostras de dourada selvagem que atingiram concentrações da ordem de  $1\text{ mg kg}^{-1}$ . Estes valores, superiores ao limite indicado pela UE, foram obtidos em exemplares de grandes dimensões (cerca de 57 cm e 3 kg).

Relativamente aos níveis médios de chumbo e cádmio encontrados para as três espécies, quer de aquicultura quer selvagens, foram sempre inferiores aos limites propostos pela UE ( $0,2\text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,05\text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). Os níveis mais baixos destes dois metais (abaixo dos limites de detecção) foram registados nos exemplares de truta selvagem enquanto que os mais elevados foram obtidos nas amostras de dourada selvagem,  $0,08\text{ mg kg}^{-1}$  para o Pb e de  $0,05\text{ mg kg}^{-1}$  para o Cd. Pérez Cid *et al.* [8] obtiveram resultados semelhantes em robalo selvagem da Ria de Aveiro. Estudos realizados por outros autores revelaram, contudo, teores mais elevados dos que os obtidos neste trabalho, tanto para robalos de aquicultura [9] [10] [11] como para os selvagens [9] [12] e também de dourada selvagem [13] [14].

### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os limites propostos pela UE para os três metais, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o consumo destas espécies de aquicultura não representa risco para o consumo humano. Em relação às douradas de habitat selvagem o seu consumo deverá ser parcimonioso, pois exemplares de maiores dimensões são susceptíveis de apresentar valores superiores a  $0,5\text{ mg kg}^{-1}$  de mercúrio.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projecto QCA III – PO MARE “Valorização e Inovação em Produtos da Pesca – 22-05-01- FDR-0006 – Vigilância, Segurança e Qualidade Alimentar”.



**Tabela 1** – Níveis de mercúrio total, cádmio e chumbo ( $\text{mg kg}^{-1}$ , base húmida) na parte edível de dourada, robalo e truta de aquicultura e habitat selvagem.

|                    | Mercúrio                             |                        | Cádmio                  |                              | Chumbo                     |           |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------|
|                    | Média $\pm$ ds <sup>(1)</sup><br>(n) | Min-Máx <sup>(2)</sup> | Média $\pm$ ds<br>(n)   | Min-Máx                      | Média $\pm$ ds<br>(n)      | Min-Máx   |
| <b>Dourada</b>     |                                      |                        |                         |                              |                            |           |
| <b>Aquicultura</b> | 0,10 $\pm$ 0,03<br>(51)              | 0,04-0,17              | 0,01 $\pm$ 0,01<br>(35) | <LD <sup>(3)</sup> -<br>0,02 | <LD <sup>(4)</sup><br>(36) | <LD-0,09  |
| <b>Selvagem</b>    | 0,58 $\pm$ 0,44<br>(11)              | 0,06-1,2               | 0,03 $\pm$ 0,02<br>(10) | 0,01-0,05                    | 0,06 $\pm$ 0,02<br>(10)    | <LD-0,08  |
| <b>Robalo</b>      |                                      |                        |                         |                              |                            |           |
| <b>Aquicultura</b> | 0,12 $\pm$ 0,04<br>(53)              | 0,07-0,21              | <LD<br>(23)             | <LD-0,02                     | <LD<br>(23)                | <LD-0,07  |
| <b>Selvagem</b>    | 0,14 $\pm$ 0,05<br>(15)              | 0,09-0,27              | 0,01 $\pm$ 0,01<br>(9)  | <LD-0,01                     | 0,05 $\pm$ 0,00<br>(9)     | 0,05-0,06 |
| <b>Truta</b>       |                                      |                        |                         |                              |                            |           |
| <b>Aquicultura</b> | 0,08 $\pm$ 0,02<br>(29)              | 0,03-0,16              | 0,01 $\pm$ 0,01<br>(11) | 0,01-0,02                    | 0,05 $\pm$ 0,02<br>(11)    | <LD-0,08  |
| <b>Selvagem</b>    | 0,06 $\pm$ 0,02<br>(4)               | 0,04-0,09              | <LD<br>(4)              | <LD                          | <LD<br>(4)                 | <LD       |

<sup>1</sup> desvio padrão; <sup>2</sup> teores mínimos e máximos obtidos; <sup>3</sup> Limite de detecção para Cd: 0,01; <sup>4</sup> Limite de detecção para Pb: 0,05.

## Referências

- [1] – DGPA - *Aquicultura*. <http://www.dg-pescas.pt> (2004)
- [2] – FAO - *The state of world fisheries and Aquaculture, 2002 Sofia report*, FAO Information Division (2002)
- [3] - S. Testi A., Bonaldo P.P., Gatta A. Badiani - *Food Chemistry* **98** (2006) 104
- [4] – UE - *Regulamento (CE) N.º 1881/2006*. JO L364, 20.12.06 (2006) 5
- [5] – W.R. Hatch, W.L. Ott - *Analyt. Chem.* **40** (1968) 2085
- [6] – C.R. Joiris, L. Holsbeek, J.M. Bouquegneau, M. Bossicart - *Water Air Soil Pollution* **56** (1991) 283
- [7] – L. Jorhem - *J. AOAC Int.* **83:5** (2000) 1204
- [8] – B. Pérez Cid, C. Boia, LL. Pombo, EE. Rebelo – *Food Chemistry* **75** (2001) 93
- [9] – C. Alasalvar, K.D.A. Taylor, E. Zubcov, F. Shahidi, M. Alexis – *Food Chemistry* **79** (2002) 145
- [10] – G. Dugo, L. La Pera, A. Bruzzese, T.M. Pellicanò, V. Lo Turco – *Food Control* **17** (2006) 146
- [11] – B. Ersoy, Y. Yanar, A. Küçükgülmez, M. Çelik – *Food Chemistry* **99** (2006) 748
- [12] – O. Dalman, A. Demirak, A. Balci - *Food Chemistry* **95** (2006) 157
- [13] – M. Canli, G. Atli – *Environmental Pollution* **121** (2003) 129
- [14] – A. Türkmen, M. Türkmen, Y. Tepe, I. Akyurt - *Food Chemistry* **91** (2005) 167



# COMPARATIVE STUDY OF POLYPHENOLIC CONTENTS IN SEVERAL DRINKS

*Paixão, N.; Gouveia, C.; Silva, C.; Gouveia, C.; Caboz, J.; Marques, J.C.; Câmara, J.S.*  
Centro de Química da Madeira, Departamento de Química da Universidade da Madeira, 9000-390  
Funchal. Portugal,

**Abstract:** The objective of this study was to quantify the total polyphenol content from several beverages and soft drinks such as Madeira wines, 4 varieties of green and black tea, 4 different beers, and 4 whiskeys. The total phenolics were assayed colorimetrically by means of the Folin-Ciocalteu method. A 2.5 ml amount of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent, 2 ml of 7.5% sodium carbonate, and 0.5 ml of phenolic extract were mixed well. The absorbance was measured at 765 nm after 15 min of heating at 45 °C. A mixture of water and reagents was used as a blank. The content of phenolics was expressed as gallic acid equivalents, and the yield was referred to the initial sample, in a dry basis.

The results show that the contents of total polyphenols was significantly higher in red TNM wine (788 mg/l) and green-mentha tea (763 mg/l) than in “black” beer (653 mg/l) ( $p < 0,05$ ). In contrast, the Highland Clan whisky contains only 95 mg/l of total polyphenols.

## 1. INTRODUCTION

Phenolic compounds or polyphenols constitute one of the most numerous and widely distributed groups of substances in the plant kingdom with more than 8000 phenolic structures currently known. Tea, mainly green tea, red wines, beers and other foods may have very complex phenolic composition that changes over their shelf-life [1]. They are products of the secondary metabolism of plants and arise biogenetically from two main primary synthetic pathways: the shikimate pathway and the acetate pathway. The occurrence of these substances in wines is not only a consequence of their extraction from grapes during winemaking. Once grapes are crushed before the beginning of alcoholic fermentation, several condensation reactions which involve some of those molecules (especially anthocyanins, catechins and procyanidins) take place, resulting in the formation of new polymeric pigments.

Recently, there is a considerable interest in the food industry and in preventive medicine in the development of “natural antioxidants” from plant material. Flavonoids and other phenolic compounds in plants have received much attention in the prevention of human neurodegenerative diseases such as cardiovascular disorders and cancer. They are effective radical scavengers with respect to oxygen free radicals and lipid peroxidation, which is determined by their reactivity as hydrogen- or electron- donating agents the stability of the resulting antioxidant-derived radical and their metal chelation properties. Polyphenols also have been reported to demonstrate antibacterial, antimutagenic, anti-inflammatory and vasodilatory actions [2]. Protection provided by fruits, vegetables, and beverages may, in part, be associated with polyphenol compounds with antioxidant activity. These properties of red wines have been correlated with their content in flavan-3-ols, anthocyanins and acid tannic, although it is believed that the antioxidant properties are linked with the total polyphenol concentration rather than individual polyphenols. Some of these compounds may act selectively at very low concentrations to inhibit *ex vivo* LDL oxidation *in vitro*. Besides, the

grape phenolic compounds are very important constituents of wines since they contribute to colour, astringency and bitterness, oxidation reactions and ageing behaviour of wines.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Samples

Commercial samples of wines from Tinta Negra Mole (TNM) variety (2005 vintage), **beers** (*Black, Cergal, Coral and Cheers*), **teas** (*Green, Green-mentha, Citron-tree and Black*) and **whisky** (*Long John- LJ; William Grant's- WG; Johnnie Walker- JW; and Highland Clan-HC*) are used in this study. The TNM wine samples, produced by two vinification processes, modern and traditional, were supplied by Madeira Wine Company. All technological processes (crushing, fermentation, racking and fining) were carried out under industrial conditions. The wine samples were designated as follows: **DM**- sweet wine by modern process; **DT**- sweet wine by traditional process; **SM**- dry wine by modern process; **ST**- dry wine by traditional process. Tea fusions were prepared by adding 300ml boiling water to 3g of tea bags. After 3 min continuous stirring, the brew was filtered through a tea strainer to remove particulate matter. For all samples analysis was carried out in triplicate.

### 2.2. Chemicals

2,2-Azino-bis-(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the crystallized diammonium salt form, Folin reagent, Gallic acid, Potassium persulfate, (Trolox), 2,2- dipyridyl, Trichloroacetic acid (TCA), Citric acid from Fluka, Sodium tartrate, Iron chloride were from Riedel de Haën, Sodium Carbonate from Panreac and Methanol 99.9% purity from Sigma Aldrick.

### 2.3. Equipment

The equipment used in this work was a Perkin Elmer Lambda 2 spectrometer. All samples were analysed in 10 mm quartz cells at room temperature.

### 2.4. Determination of Total Polyphenols Content (TPC)

The total phenolic contents of wine samples were determined with the Folin-Ciocalteu's reagent (FCR) [3], using gallic acid as standard.

The exact chemical nature of the FCR reagent is not known, but it is believed to contain heteropolyphosphotunstates- molybdates. Sequences of reversible one- or two-electron reduction reactions lead to blue species, possibly (PMoW11O40)<sup>4-</sup>. In essence, it is believed that the molybdenum is easier to be reduced in the complex and electron-transfer reaction occurs between reductants and Mo(VI):  $Mo(VI) + e \rightarrow Mo(V)$ .

Obviously, the FCR reagent is nonspecific to phenolic compounds as it can be reduced by many nonphenolic compounds [e.g., vitamin C, Cu(I), etc.]. Phenolic compounds react with FCR only under basic conditions (adjusted by a sodium carbonate solution to pH 10). Dissociation of a phenolic proton leads to a phenolate anion, which is capable of reducing FCR. The blue compounds formed between phenolate and FCR are independent of the structure of phenolic compounds, therefore ruling out the possibility of coordination complexes formed between the metal center and the phenolic compounds.

Despite the undefined chemical nature of FCR, the total phenols assay by FCR is convenient, simple, and reproducible. As a result, a large body of data has been accumulated, and it has become a routine assay in studying phenolic antioxidants.

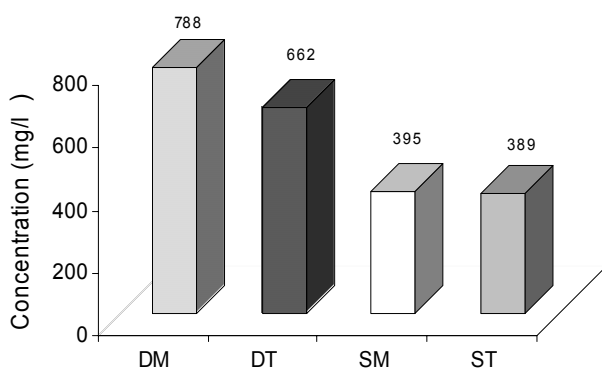
To 1 ml of wine sample (adequately diluted), 0.25 ml of carbonate-tartrate solution (20 g of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1.2 g of Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O in 100 ml of distilled water) and 0.025 ml of Folin-

Ciocalteu's reagent were added. The absorbance of the sample was measured at 700 nm after 30 min of reaction. The results were expressed as mg of Gallic acid equivalents (GAE) l<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

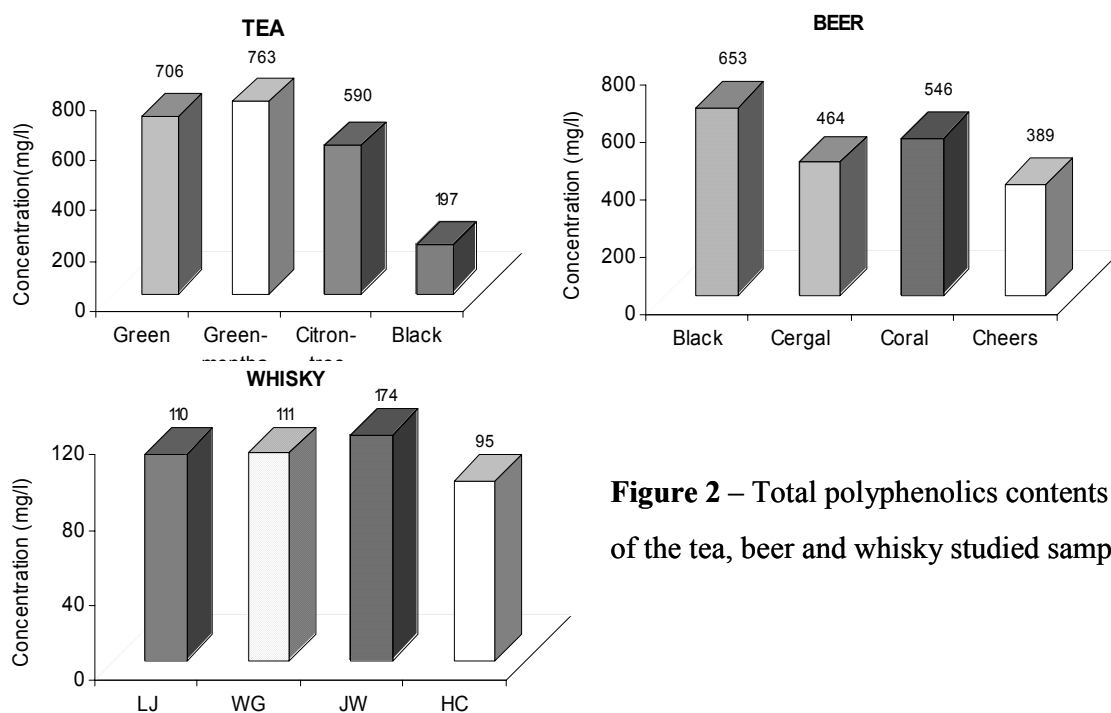
As it was expected, the average content of total polyphenols was significantly higher in red TNM wine and tea samples than whisky samples. It surprises the high content of phenolic compounds in beer samples mainly in Black and Coral Beers.

The mean values of total polyphenols determined in TNM wines are presented in Figure 1. As can be seen the total polyphenols content in sweet wines (DM and DT) was statistically significant higher than in dry TNM wines (SM and ST). There was not significant differences between the vinification process, modern and traditional, employed in the production of TNM red wines, that means that these winemaking processes has a little influence on phenolics.



**Figure 1** - Influence of the vinification process and sugar content in the polyphenolic levels.

As expected, tea samples showed high levels of polyphenolic compounds. They were highest in the green-mentha (763 mg/l) and green (706 mg/l) tea and significantly lower in Black (only 197 mg/l) tea (Figure 2).



**Figure 2** – Total polyphenolics contents of the tea, beer and whisky studied samples.

Analysis of the total polyphenols content of beers revealed that, in general, it was a rich source of antioxidant compounds. Black (653 mg/l), Coral (546 mg/l) and Cergal (464 mg/l) beers, had levels surprisingly higher, very close to the contents determined in red wines and tea samples. Whisky samples analysed present lower levels when compared with the others investigated samples.

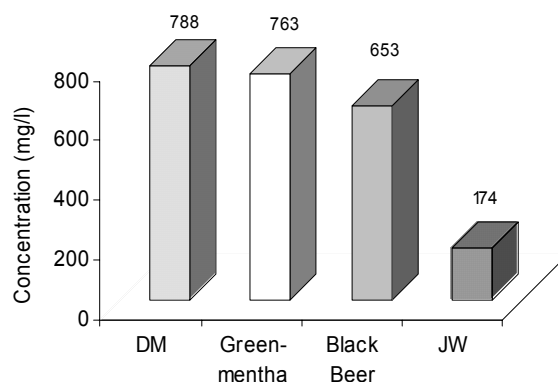


Figure 3 - Studied samples with the highest content of polyphenolic compounds.

### Acknowledgment

This study was supported by INTERREG III-B MAC (Feder) (project ANTIVINMAC 05/MAC/2.3/M28).

### References

- [1] - Haslam, E. Natural polyphenols as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **59** (1996) 205.
- [2] – J.N. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley, C.A. Rice-Evans – *Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls*. *FEBS Lett.* **384** (1996) 240.
- [3] – R.C. Rossana, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G.M. Pastore, N. Durán – *Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines*. *Food Chem.* **82** (2003) 409-416.

# COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AZEITONAS DESCAROÇADAS “ALCAPARRA” PRODUZIDAS EM TRÁS-OS-MONTES

Sousa, A.<sup>1</sup>; Ferreira, I.C.F.R.<sup>1</sup>, Estevinho, L.<sup>1</sup>; Andrade, B.A.<sup>2</sup>; Valentão, P.<sup>2</sup>; Bento, A.<sup>1</sup>; Seabra, R.M.<sup>2</sup>; Pereira, J.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. jpereira@ipb.pt

<sup>2</sup> REQUIMTE/Serviço de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

**Palavras-chave:** “alcaparras”, composição fenólica, actividade antimicrobiana.

**Resumo:** Em Trás-os-Montes, são produzidas azeitonas descaroçadas em pedaços, conhecidas como “alcaparras”, muito apreciadas e consumidas na região principalmente nos períodos de Outono-Inverno. Com a realização do presente trabalho, pretendeu-se por um lado proceder à caracterização da fracção fenólica deste tipo de azeitona de mesa por HPLC/DAD, e por outro proceder à avaliação *in vitro* de extractos aquosos de “alcaparra” contra diferentes microrganismos patogéneos agentes de infecções intestinais e respiratórias, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). Foram identificados e quantificados três compostos flavonóides: luteolina 7-O-glucosido, apigenina 7-O-glucosido e luteolina. Verificou-se, a baixas concentrações de extracto de “alcaparra” (0,05 mg/mL), uma inibição significativa do crescimento das bactérias, com excepção de *P. aeruginosa*. Os extractos estudaram mostraram, nas concentrações testadas, não possuir actividade antifúngica.

## 1. INTRODUÇÃO

A azeitona de mesa é um alimento tradicionalmente incluído na dieta Mediterrânica, sendo considerada uma fonte importante de antioxidantes naturais, nomeadamente compostos fenólicos e vitamina E. A presença destes compostos nos alimentos tem sido relacionada com uma menor taxa de incidência de doenças coronárias nos países da Bacia do Mediterrâneo.

Por azeitona de mesa, entende-se o produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea sativa* Hoffg Link, em estado de maturação conveniente, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características de boa conservação [1]. Existem diferentes tipos de azeitona de mesa dependendo sobretudo do grau de maturação dos frutos utilizados na sua preparação, do processo de preparação e/ou da sua forma de apresentação.

Em Trás-os-Montes, há um grande consumo dos diferentes tipos de azeitona de mesa, sendo as azeitonas descaroçadas tipo “Alcaparra”, produto obtido de forma tradicional, largamente consumidas nos meses de Outono-Inverno. As “alcaparras” são processadas de frutos verdes e verde amarelados, que são quebrados com a ajuda de um martelo de madeira sendo a polpa separada do caroço. A polpa fica separada em aproximadamente duas partes iguais perpendiculares ao eixo máximo do fruto. Os frutos são posteriormente colocados em água que é trocada diariamente ou cada dois dias durante uma semana. Este tratamento remove o amargor das azeitonas sendo as azeitonas temperadas com sal, ervas aromáticas e casca de laranja antes de serem consumidas [2].

Os compostos fenólicos e seus glucosidos representam 1 a 3% do peso da azeitona, sendo os álcoois fenólicos, flavonóides e secoiridóides as classes mais importantes presentes em

azeitona de mesa os ácidos fenólicos [3-5]. A fracção fenólica é muito complexa e pode variar tanto em quantidade como qualidade dependendo do método de processamento [6], da cultivar [7], das condições climáticas [8], do regime hídrico [9] e do grau de maturação do fruto [10].

Alguns trabalhos têm demonstrado propriedades antimicrobianas de extractos de produtos da oliveira como as folhas [11], o fruto [6] e de compostos isolados deles como a oleuropeína, hidroxitirosol [12] e álcoois alifáticos [13] sobre o crescimento de diferentes microrganismos.

Com a realização do presente trabalho, pretendeu-se por um lado proceder à caracterização da fracção fenólica deste tipo de azeitona de mesa por HPLC/DAD, e por outro proceder à avaliação *in vitro* de extractos aquosos de “alcaparra” contra diferentes microrganismos patogêneos agentes de infecções intestinais e respiratórias, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de “alcaparras”

As amostras foram obtidas num supermercado local e congeladas. Posteriormente, foram liofilizadas, trituradas e armazenadas num exsiccador protegidas da luz.

### 2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos

A extracção foi efectuada de acordo com o descrito por Vinha *et al.* [14].

A análise foi efectuada por HPLC-DAD nas condições referidas por Vinha *et al.* [14]. A quantificação dos compostos fenólicos foi efectuada por comparação da absorvância a 350 nm registada nos cromatogramas em relação a padrões externos.

### 2.3. Actividade antimicrobiana

Os extractos foram obtidos usando água em ebulição durante 45 min sendo, posteriormente, congelados, liofilizados e redissolvidos em água (50 mg/mL).

Bactérias testadas: *B. cereus* CECT 148, *B. subtilis* CECT 498, *S. aureus* ESA 7, *E. coli* CECT 101, *P. aeruginosa* CECT 108 e *K. pneumoniae* ESA 8. Fungos testados: *C. albicans* CECT 1394 e *C. neoformans* ESA 3. Os microrganismos CECT foram adquiridos da Coleção Espanhola de Culturas Tipo da Universidade de Valência, enquanto que os microrganismos ESA são isolados clínicos identificados no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

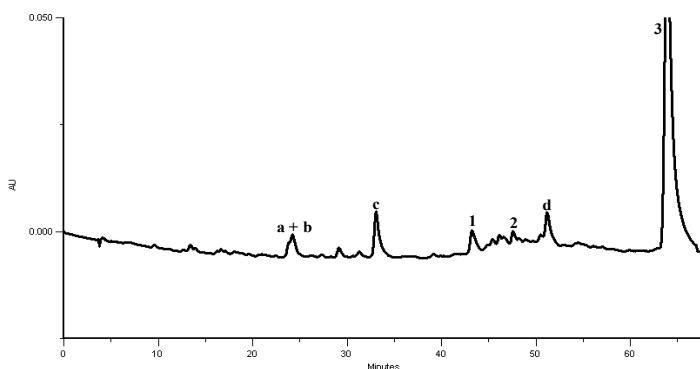
Foi efectuada um *screening* de actividades antimicrobianas contra bactérias Gram - (*E. coli*, *P. aeruginosa*, e *K. pneumoniae*), bactérias Gram + (*B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus*) e leveduras (*C. albicans*, *C. neoformans*), tendo sido determinadas as concentrações mínimas inibitórias de crescimento (MICs em mg/mL) e os halos de inibição pelo método de difusão radial em agar [15]. A ampicilina (antibacteriano) e a cicloheximida (antifúngico) foram usadas como padrões.

As bactérias mais susceptíveis (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) foram, posteriormente, utilizadas em ensaios de actividade antimicrobiana em meio líquido de acordo com o descrito pelo nosso grupo [2]. Os valores da velocidade de crescimento bacteriano foram obtidos por regressão linear na fase de crescimento exponencial, nos gráficos de densidade óptica a 540 nm *versus* tempo de incubação.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados, nas amostras de “alcaparras”, três compostos fenólicos: luteolina 7-*O*-glucosido (1), apigenina 7-*O*-glucoside (2) e luteolina (3) (Fig. 1).



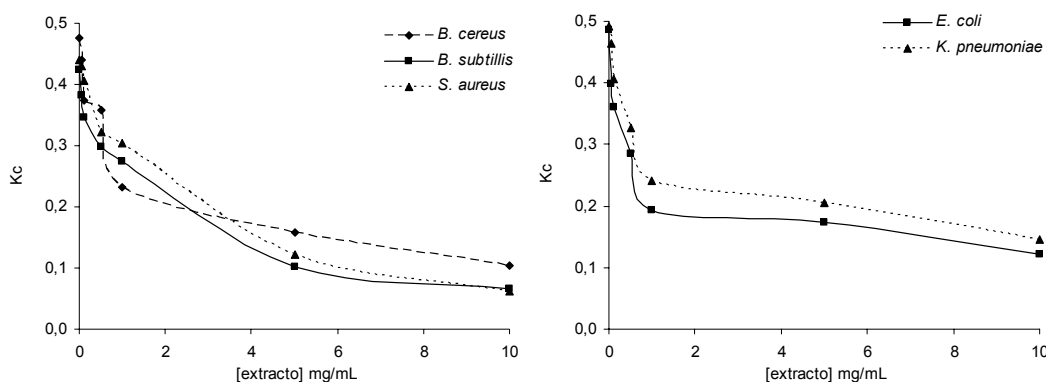
**Figura 1.** Perfil fenólico da amostra de “alcaparras”.

O extracto de “alcaparras” inibiu todas as bactérias testadas, com excepção da bactéria Gram-, *P. aeruginosa*. *B. cereus* e *K. pneumoniae* foram as bactérias Gram+ e Gram- mais susceptíveis, respectivamente (Tabela 1). As leveduras testadas, *C. albicans* e *C. neoformans*, foram resistentes ao extracto de “alcaparras”.

**Tabela 1.** Actividade antimicrobiana do extracto de “alcaparras”.

| Samples       | MIC (mg/mL)        |                    |                   |                      |                   |                      |                    |                      |
|---------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|               | <i>B. cereus</i>   | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i>  | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i>    | <i>K. pneumoniae</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. neoformans</i> |
| Alcaparra     | 25 (9.5)<br>(++++) | 25 (5)<br>(++)     | 25 (5.0)<br>(++)  | 50<br>(-)            | 50 (9)<br>(+++)   | 10 (3.625)<br>(++)   | 50<br>(-)          | 50<br>(-)            |
| Ampicillin    | 0.00313<br>(++++)  | 0.0125<br>(++++)   | 0.00625<br>(++++) | 0.00625<br>(++++)    | 0.00625<br>(++++) | 0.00625<br>(++++)    | NT                 | NT                   |
| Cycloheximide | NT                 | NT                 | NT                | NT                   | NT                | NT                   | 0.0125<br>(++)     | 0.00625<br>(++++)    |

Os microrganismos que demonstraram susceptibilidade nos ensaios em meio sólido foram submetidos a novos ensaios em meio líquido, de forma a comparar os efeitos na velocidade de crescimento. Os valores obtidos sugerem uma actividade antibacteriana de largo espectro e dependente da concentração de extracto. De acordo com o perfil de crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações de extracto (Fig. 2), as “alcaparras” revelaram actividade antimicrobiana contra *E. coli* > *K. pneumoniae* > *B. cereus* > *B. subtilis* > *S. aureus*.



**Figura 2.** Taxa de crescimento bacteriano (Kc) na presença de diferentes concentrações de extracto de “alcaparras”.

Este estudo sugere que as azeitonas de mesa do tipo “alcaparra” são uma boa fonte de agentes antimicrobianos contra bactérias responsáveis por infecções do tracto intestinal e respiratório. Os resultados obtidos são particularmente importantes no caso de *S. aureus*, microrganismo produtor de enterotoxinas, e de *E. coli*, ambos excepcionalmente resistentes a vários fitoquímicos. Assim, o consumo de “alcaparras” pode reduzir o risco de infecções bacterianas, devido à acção protectora dos compostos fenólicos presentes neste alimento.

#### Agradecimentos

Programa INTERREG III A, Projecto MOABEPE “Identificación de los agentes patógenos y beneficiosos de los principales cultivos de las regiones fronterizas Trás-os-Montes y Castilla y León para la realización de estrategias de control razonadas”.

#### Referências

- [1] – Norma Portuguesa (NP) 3034, 1987.
- [2] – Sousa, A.; Ferreira, I.C.R.; Calhelha, R.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J.A. – *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 8533-8538.
- [3] –Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. - *Food Chem. Toxicol.* **41** (2003) 703-717.
- [4] –Vinha, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M.B.P.P.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B. - *Food Chem.* **89** (2005) 561-568.
- [5] – Pereira, J. A.; Pereira, A.P.; Ferreira, I.C.F.R.; Valentão, P.; Andrade, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. – *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 8425-8431.
- [6] –Romero, C., Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; Garcia, A.; Garrido, A. - *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 479-484.
- [7] – Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. - *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 32-35.
- [8] – Salvador, M.D., Aranda, F., & Fregapane, G. - *Food Chem.* **73** (2001) 45–53.
- [9] – Romero, M. P.; Tovar, M. J.; Girona, J.; Motilva, M. J. - *J. Agric. Food Chem.* **50**, (2002) 5349-5354.
- [10] – Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., & Albi, M.A. - *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 121–127.
- [11] – Markin, D.; Duek, L.; Berdicevsky, I. - *Mycoses* **46** (2003), 132-136
- [12] – Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N.; Saija, A. - *J. Pharm. Pharmacol.* **51** (1999) 971-974.
- [13] – Battinelli, L.; Daniele, C.; Cristiani, M.; Bisignano, G.; Saija, A.; Mazzanti, G. - *Phytomedicine* **11** (2006) 558-563.
- [14] - Vinha, A. F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B. P. P. J. *Liq. Chrom. Relat. Tech.* **25** (2002) 151–160.
- [15] - Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M-J. R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 5831–5833.

# COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE 18 AMOSTRAS DE MÉIS PROVENIENTES DA REGIÃO DO LUSO

*Santos Dias, B.; Rodrigues da Silva, L. \**

Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Agro-Alimentares, Viseu, Portugal.

\*Telefone 232446600 Fax 232426536 e-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** mel, parâmetros físico-químicos

**Resumo:** Este trabalho teve como objectivos a análise da composição físico-química 18 amostras de méis multiflorais provenientes de diferentes apicultores da Região do Luso.

Os parâmetros determinados neste ensaio foram os seguintes: humidade, brix,  $a_w$ , condutividade eléctrica, cinzas totais, alcalinidade das cinzas, pH, acidez total, acidez livre e acidez lactónica.

Os resultados obtidos indicaram que os parâmetros analisados se encontravam dentro dos limites estabelecidos na legislação portuguesa, no entanto verifica-se que dentro da mesma região existe uma grande diversidade ao nível da composição físico-química de méis que estará provavelmente associada às condições edafoclimáticas da região e às características genéticas da *Apis mellifera*.

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre parte vivas das plantas que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Decreto-Lei nº 216/2003).

O mel é constituído essencialmente por diversos açúcares predominando a glucose e a frutose. Contêm ainda proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos matérias minerais pólen e outras substâncias podendo ter também, sacarose maltose, meleziote e outros oligossacarídeos (incluindo dextrinas) e ainda vestígios de fungos, algas, leveduras, e de outras partículas sólidas provenientes da colheita do mel.

O teor de água de um mel influencia consideravelmente a sua conservação. É considerado um parâmetro de classificação de qualidade pois condiciona a granulação, e indirectamente a fermentação. O conteúdo em água nos méis varia consideravelmente, oscilando habitualmente entre 16 e 18 %.

A condutividade eléctrica é uma propriedade física importante do mel, que está relacionada com o seu conteúdo em sais minerais, ácidos orgânicos, proteínas, açúcares e polióis. O valor da condutividade eléctrica do mel permite identificar a sua origem (melada e néctar), fornece orientações sobre a fonte do néctar e permite a detecção de alimentação artificial das abelhas com açúcar.

O conteúdo das cinzas solúveis e insolúveis, cinzas sulfatadas e a alcalinidade das cinzas (solúveis, insolúveis e totais), são importantes para o conhecimento do conteúdo mineral. O teor de cinzas solúveis dá-nos indicações sobre a presença de óxidos alcalinos e alcalinos – terrosos. A determinação das cinzas insolúveis permite-nos obter informação sobre a matéria siliciosa presente nas cinzas e finalmente, a alcalinidade das cinzas reflecte a presença de cationes combinados com ácidos orgânicos.

O pH indica a acidez actual do mel, a qual contribui para a estabilidade perante ataques microbianos. Em méis florais o pH encontra-se entre 3,2 – 4,5, enquanto que nos méis de melada o pH pode atingir valores de 5,5.

O valor máximo de acidez livre permitido pela legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 216/2003) é de 50 meq/kg de mel. A relação acidez lactónica / livre fornece informações sobre a origem do mel. Este parâmetro apresenta um valor médio de 0,335 para méis de néctar. Para méis de melada o valor médio é inferior, cerca de 0,127.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Para a realização deste trabalho utilizámos 18 amostras de mel provenientes de diferentes apicultores da região do Luso (cresta de 2005). As amostras foram conservadas em local fresco e foram analisadas no menor espaço de tempo possível.

O teor de humidade foi determinado através do método AOAC (1990).

Para a determinação da condutividade eléctrica, cinzas totais, e alcalinidade das cinzas utilizámos o método de Sancho *et al.* (1991;1992). Determina-mos o pH, acidez total, acidez livre e acidez lactónica, através do método AOAC (1990).

O teor em açúcares foi determinado utilizando um refractómetro, obtendo os resultados expressos em graus Brix.

Os distintos tipos de cinzas e respectivas alcalinidades foram determinadas através da condutividade eléctrica, que foi medida a 20°C através de dissoluções de 10 gramas de mel em 75 ml de água, de acordo com o método do AOAC (1990).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos nas 18 amostras analisadas relativamente aos parâmetros físico-químicos, teor de humidade, brix,  $a_w$ , condutividade eléctrica, cinzas, alcalinidade das cinzas, pH, acidez livre, acidez lactónica e acidez total, estão apresentados na tabela 1.

A actividade da água das diferentes amostras de mel, apresentaram valores que se situam entre 0,53 – 0,58. O valor médio da  $a_w$  situa-se em 0,56

| Amostra   | Humidade (%) | Brix (%) | aw   | pH   | Acidez livre (meq/kg de mel) | Acidez láctónica (meq/kg de mel) | Acidez total (meq/kg de mel) | Cond. eléctrica ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) | Cinzas (%) |            | Cinzas sulfatadas (%) |            | Alcalinidade das cinzas (ml de ácido N/100 g de mel) |          |            |
|-----------|--------------|----------|------|------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|------------|------------|-----------------------|------------|--|----------|------------|
|           |              |          |      |      |                              |                                  |                              |  | Solúveis   | Insolúveis | Solúveis              | Insolúveis | Totais   | Solúveis | Insolúveis |
| 1         | 17,04        | 80,60    | 0,56 | 4,31 | 33,75                        | 8,25                             | 42,03                        | 473,55                                   | 0,39       | 0,33       | 0,06                  | 0,57       | 5,16   | 4,01     | 1,07       |
| 2         | 15,35        | 80,60    | 0,58 | 4,34 | 26,13                        | 6,99                             | 33,12                        | 318,23                                   | 0,26       | 0,22       | 0,04                  | 0,38       | 3,47   | 2,69     | 0,72       |
| 3         | 15,83        | 80,60    | 0,58 | 3,74 | 22,94                        | 10,48                            | 33,42                        | 301,35                                   | 0,25       | 0,21       | 0,04                  | 0,36       | 3,28   | 2,55     | 0,68       |
| 4         | 14,82        | 81,20    | 0,55 | 4,12 | 29,73                        | 9,48                             | 39,21                        | 412,01                                   | 0,34       | 0,29       | 0,05                  | 0,50       | 4,49   | 3,49     | 0,93       |
| 5         | 15,27        | 80,20    | 0,58 | 4,23 | 25,07                        | 6,22                             | 31,29                        | 263,25                                   | 0,22       | 0,18       | 0,03                  | 0,32       | 2,87   | 2,23     | 0,59       |
| 6         | 15,65        | 80,40    | 0,57 | 4,25 | 26,08                        | 4,24                             | 30,32                        | 418,22                                   | 0,35       | 0,29       | 0,05                  | 0,51       | 4,56   | 3,54     | 0,94       |
| 7         | 13,52        | 82,20    | 0,53 | 3,78 | 16,37                        | 4,74                             | 21,11                        | 114,71                                   | 0,09       | 0,08       | 0,01                  | 0,14       | 1,24   | 0,96     | 0,26       |
| 8         | 13,98        | 80,80    | 0,56 | 3,83 | 12,91                        | 4,50                             | 17,41                        | 168,85                                   | 0,14       | 0,12       | 0,02                  | 0,20       | 1,83   | 1,42     | 0,38       |
| 9         | 14,49        | 81,00    | 0,56 | 3,90 | 38,07                        | 8,99                             | 47,06                        | 415,15                                   | 0,34       | 0,29       | 0,05                  | 0,50       | 4,53   | 3,52     | 0,93       |
| 10        | 15,71        | 80,40    | 0,58 | 4,70 | 17,07                        | 11,49                            | 28,56                        | 420,34                                   | 0,35       | 0,29       | 0,05                  | 0,51       | 4,58   | 3,56     | 0,95       |
| 11        | 14,98        | 80,60    | 0,58 | 4,16 | 23,97                        | 5,24                             | 29,21                        | 385,29                                   | 0,32       | 0,27       | 0,05                  | 0,47       | 4,20   | 3,26     | 0,87       |
| 12        | 14,67        | 80,40    | 0,55 | 4,30 | 20,00                        | 5,25                             | 25,25                        | 417,44                                   | 0,35       | 0,29       | 0,05                  | 0,50       | 4,55   | 3,54     | 0,94       |
| 13        | 14,30        | 82,00    | 0,54 | 4,32 | 18,21                        | 6,14                             | 24,35                        | 420,11                                   | 0,35       | 0,29       | 0,05                  | 0,51       | 4,58   | 3,56     | 0,95       |
| 14        | 21,54        | 80,60    | 0,56 | 3,82 | 19,90                        | 9,25                             | 29,15                        | 206,27                                   | 0,17       | 0,14       | 0,03                  | 0,25       | 2,24   | 1,74     | 0,46       |
| 15        | 24,70        | 79,80    | 0,58 | 4,07 | 24,97                        | 14,25                            | 39,22                        | 436,33                                   | 0,36       | 0,30       | 0,06                  | 0,53       | 4,76   | 3,70     | 0,98       |
| 16        | 24,30        | 79,60    | 0,58 | 4,01 | 26,49                        | 10,37                            | 36,86                        | 497,45                                   | 0,41       | 0,35       | 0,06                  | 0,60       | 5,43   | 4,22     | 1,12       |
| 17        | 22,40        | 81,60    | 0,55 | 4,11 | 12,55                        | 9,69                             | 22,24                        | 391,52                                   | 0,32       | 0,27       | 0,05                  | 0,47       | 4,27   | 3,32     | 0,88       |
| 18        | 22,60        | 81,00    | 0,57 | 4,10 | 10,70                        | 10,68                            | 21,38                        | 323,36                                   | 0,27       | 0,23       | 0,04                  | 0,39       | 3,52   | 2,74     | 0,73       |
| $\bar{X}$ | 17,29        | 80,76    | 0,56 | 4,11 | 22,50                        | 8,13                             | 30,62                        | 354,64                                   | 0,29       | 0,24       | 0,44                  | 0,43       | 3,86   | 3,00     | 0,80       |
| sd        | 3,85         | 0,67     | 0,02 | 0,25 | 7,30                         | 2,84                             | 8,04                         | 107,00                                   | 0,09       | 0,07       | 0,01                  | 0,13       | 1,17   | 0,91     | 0,24       |
| Vmin      | 13,52        | 79,60    | 0,53 | 3,74 | 10,70                        | 4,24                             | 17,41                        | 114,71                                   | 0,09       | 0,08       | 0,01                  | 0,14       | 1,24   | 0,96     | 0,26       |
| Vmax      | 24,70        | 82,20    | 0,58 | 4,70 | 38,07                        | 14,25                            | 47,06                        | 497,45                                   | 0,41       | 0,35       | 0,06                  | 0,60       | 5,43   | 4,22     | 1,12       |

**Tabela 1** – Resultados obtidos das análises físico-químicas das 18 amostras de mel

O conteúdo em água é um parâmetro que nos revela as condições climatéricas, e o grau de maturação do mel. É o factor mais determinante na capacidade de armazenamento do mel. Quanto mais elevado é o teor de humidade no mel, maior é a possibilidade do desenvolvimento de fermentações. Mel com teor de humidade superior a 20% ocorre o risco de fermentar. Os teores de água obtidos estão de acordo com a legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 216/2003), à excepção das amostras 14, 15,16, 17 e 18 que apresentam valores superiores, aos permitidos. Este aumento do teor de humidade pode estar relacionado com as condições climatéricas dos dias em que se realizou a extracção do mel destas amostras, e também com a diversidade de clima existente dentro da região do Luso.

Os valores do conteúdo em açúcares (Brix) das amostras de mel estão compreendidos entre 79,60 – 82,20 °Brix, com um teor médio de 80,76 °Brix. A determinação dos níveis de sacarose são importantes, porque o elevado conteúdo em sacarose está geralmente associado á alimentação artificial das abelhas com açúcar resultando um mel pálido com pouco sabor. O principal objectivo de estabelecer um limite para o conteúdo em sacarose é desencorajar a produção de mel alimentando as abelhas com açúcar, ou adulteração por adição directa de sacarose.

A legislação portuguesa estabelece um teor máximo de cinzas, de 0,6% para méis de néctar e 1% para méis de melada. O valor médio de condutividade eléctrica obtido para as amostras de mel foi de 354,64  $\mu\text{Scm}^{-1}$  estando os restantes valores situados entre 114,71 – 497,45  $\mu\text{Scm}^{-1}$

Todas as amostras analisadas são méis de néctar uma vez que todas apresentaram uma percentagem de cinzas totais inferiores a 0,6 %. A acidez livre é um parâmetro que evidencia a fragilidade do mel e também a sua origem, (néctar ou melada). A determinação da acidez permite conhecer se ocorrem fermentações pois neste caso a acidez aumenta consideravelmente devido á fermentação dos açúcares e conversão do álcool produzido em ácido acético, por acção bacteriana. A legislação portuguesa define 50 meq/kg de mel como valor limite da acidez livre.

Os valores de acidez livre das amostras de mel estão compreendidos entre 10,70 – 38,07 meq/kg, com um valor médio de 22,50 meq/kg. Todas as amostras apresentam um valor de acidez livre inferior a 50 meq/kg de mel, pelo que se encontram dentro dos limites estabelecidos pela legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 216/2003).

Os valores de pH obtidos para as amostras do mel situam-se entre 3,74 – 4,70.

## REFERÊNCIAS

- BIANCHI, E. M. (1990), Control de calidad de la miel y la cera, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO).
- PT 2003. Decreto-Lei n. 214/2003. *DR I* Série de 18.09.2003, pp 6057-6060.
- Sancho, M.T. (1992) – Aging of honey. *J. Agric. Food Chem.* **40**: pág. 1134-138.

# COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRICIONAL DE COGUMELOS SILVESTRES COMESTÍVEIS DO NORDESTE DE PORTUGAL

Barros, L.<sup>1</sup>; Baptista, P.<sup>1</sup>; Correia, D.M.<sup>1</sup>; Casal, S.<sup>2</sup>; Oliveira, B.<sup>2</sup> e  
Ferreira, I.C.F.R.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

<sup>2</sup> REQUIMTE/Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal.

Tel +351-273 303219 Fax +351-273 325 405 e-mail: iferreira@ipb.pt

**Palavras-chave:** Cogumelos; composição química; ácidos gordos; açúcares; valor nutricional.

**Resumo:** Neste trabalho, determinou-se a composição química e o valor nutricional de cinco espécies de cogumelos silvestres comestíveis (*Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Tricholoma portentosum*) vulgarmente consumidos na região de Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal. A avaliação da composição química incluiu determinação de humidade, gordura total, proteína total, cinzas, hidratos de carbono e do valor nutricional. O perfil de macronutrientes revelou genericamente que os cogumelos silvestres são fontes ricas em proteínas e hidratos de carbono, e que contêm quantidades reduzidas de gordura. A análise da composição em ácidos gordos, realizada por cromatografia gás-líquido acoplada a um detector de ionização de chama (GC/FID), permitiu a quantificação de quinze ácidos gordos. Os ácidos gordos insaturados e, em particular, os ácidos oleico e linoleico, são os mais abundantes. Determinou-se também a composição em açúcares individuais por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de índice de refração (HPLC/RI), sendo o manitol e a trealose os açúcares mais abundantes.

## 1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 2000 espécies de cogumelos na natureza; contudo, menos de 25 espécies são considerados como alimento e somente alguns destes são comercializados. Os cogumelos silvestres têm vindo a ser cada vez mais importantes na dieta alimentar devido ao seu valor nutricional [1,2], as suas características organolépticas [3] e farmacológicas [4,5]. No entanto, no caso de cogumelos Portugueses, para além de estudos das suas propriedades farmacológicas descritos por nós [6-8], não existem estudos acerca do seu valor nutricional e composição química. As doenças associadas à carne animal têm suscitado enorme discussão em torno da questão da alimentação levando a uma maior procura de produtos de origem vegetal que substituam a alimentação tradicional. Nessa perspectiva, o consumo de cogumelos silvestres tem vindo a aumentar devido ao seu elevado teor de proteínas e sais minerais. Alguns estudos indicam mesmo uma composição em aminoácidos comparável à encontrada nas proteínas animais [9,10].

Têm sido descritos vários trabalhos acerca da composição química e do valor nutricional de várias espécies de cogumelos silvestres comestíveis oriundos de vários países, nomeadamente de Espanha [11], Itália [12], Turquia [13], Índia [14] e Nigéria [15]. No entanto, não são conhecidos estudos em cogumelos do Nordeste de Portugal, pelas suas condições edafoclimáticas e riqueza da flora, é uma das regiões dos países europeus com maior diversidade de cogumelos silvestres, muitos dos quais com grande importância gastronómica. Assim, apresenta-se neste trabalho uma avaliação da composição química de cinco espécies de cogumelos silvestres comestíveis (*Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* e *Tricholoma portentosum*), que engloba a determinação da

humidade, proteínas, gordura, hidratos de carbono e cinzas, e uma estimativa do seu valor nutricional. Foi ainda obtido o perfil em ácidos gordos e açúcares individuais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

Os exemplares de *Agaricus arvensis* (Schaeff.:Fr.) e *Leucopaxillus giganteus* (Sowerby) Singer foram obtidos em prado, enquanto que os exemplares de *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst., e *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quéf. foram obtidos em pinhal, localizados em Bragança, nordeste de Portugal, no Outono de 2005. Após identificação taxonómica, os cogumelos foram liofilizados e triturados. Foram analisadas três amostras de cada espécie.

### 2.2. Análises

A composição química foi avaliada determinando a humidade, proteínas, gorduras, hidratos de carbono e cinzas, de acordo com os procedimentos AOAC (1995). A proteína total foi obtida pelo método macroKjeldahl, multiplicando o N total por 4,38. A gordura total foi determinada por extracção em Soxhlet com éter de petróleo. As cinzas foram obtidas por incineração a  $600 \pm 15$  °C. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença. A energia total calculou-se de acordo com a equação: Energia (kcal) =  $4 \times (\text{g proteínas} + \text{g hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{glípidos})$ .

A composição em ácidos gordos foi determinada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), de acordo com a norma ISO 5509 (2000). A identificação dos ácidos gordos foi efectuada comparando o tempo de retenção da amostra com o dos padrões.

A composição em açúcares foi obtida por cromatografia líquida de alta resolução com um detector de índice de refacção (HPLC-RI), alterando ligeiramente o procedimento descrito por Harada *et al.* [16]. Os resultados, expressos em g/100 g de peso fresco, foram calculados utilizando um padrão interno. A identificação dos açúcares foi efectuada comparando o tempo de retenção da amostra com o dos padrões.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, apresentam-se os resultados da composição química e do valor energético obtido para as espécies de cogumelos em estudo. Verificou-se um elevado teor em proteínas e hidratos de carbono, e uma baixa percentagem de gorduras. Todas as espécies analisadas apresentaram uma composição química concordante com o que está descrito para outras espécies de cogumelos comestíveis [11-15]. Com base nas análises efectuadas verificou-se que 100 g dos cogumelos estudados fornecem em média 28 Kcal. Os valores mais elevados foram obtidos para *L. deliciosus*, enquanto que *A. arvensis* apresentou uma contribuição energética mais baixa.



**Tabela 1.** Composição química (g/100 g de peso fresco) e valor energético de cinco espécies de cogumelos silvestres comestíveis Portugueses (Média  $\pm$  s; n=3).

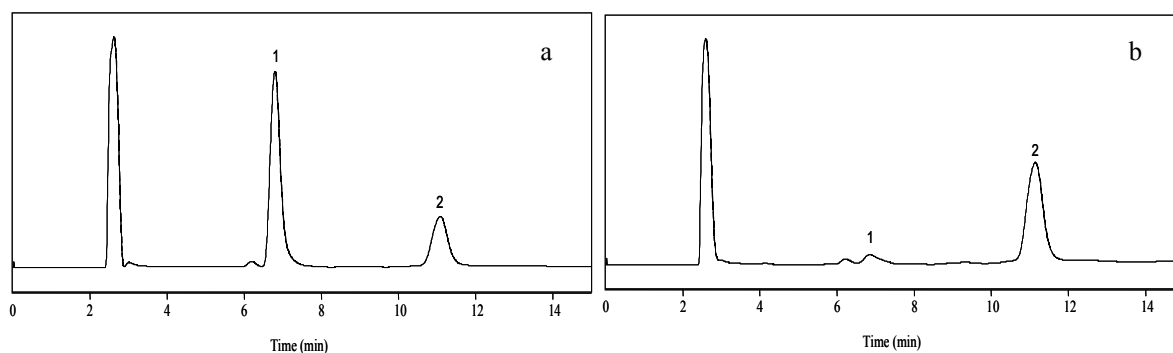
|                     | Cogumelos          |                      |                     |                      |                       |
|---------------------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|                     | <i>A. arvensis</i> | <i>L. deliciosus</i> | <i>L. giganteus</i> | <i>S. imbricatus</i> | <i>T. portentosum</i> |
| Humidade            | 94,90 $\pm$ 0,75   | 90,05 $\pm$ 0,53     | 92,43 $\pm$ 0,76    | 93,89 $\pm$ 0,00     | 93,05 $\pm$ 0,51      |
| Gordura total       | 0,14 $\pm$ 0,00    | 0,22 $\pm$ 0,00      | 0,41 $\pm$ 0,02     | 0,09 $\pm$ 0,01      | 0,38 $\pm$ 0,02       |
| Proteína total      | 2,87 $\pm$ 0,19    | 2,96 $\pm$ 0,04      | 3,40 $\pm$ 0,01     | 2,35 $\pm$ 0,02      | 2,12 $\pm$ 0,08       |
| Cinzas              | 0,18 $\pm$ 0,01    | 0,51 $\pm$ 0,02      | 0,65 $\pm$ 0,04     | 0,29 $\pm$ 0,08      | 0,81 $\pm$ 0,03       |
| Hidratos de carbono | 1,91 $\pm$ 0,24    | 6,26 $\pm$ 0,15      | 3,11 $\pm$ 0,21     | 3,38 $\pm$ 0,03      | 3,64 $\pm$ 0,16       |
| Energia (Kcal)      | 20,38 $\pm$ 1,71   | 38,86 $\pm$ 0,75     | 29,73 $\pm$ 1,05    | 23,73 $\pm$ 0,28     | 26,46 $\pm$ 1,14      |

Na tabela 2 apresentam-se os resultados da composição de ácidos gordos saturados (AGS), ácidos gordos monoinsaturados (AGMI) e ácidos gordos polinsaturados (AGPI) presentes nas espécies de cogumelos em estudo. Verificou-se que os ácidos gordos mais abundantes eram o ácido linoleico (C18:2) e o ácido oleico (C18:1) seguido pelo ácido palmítico (C16:0). Neste trabalho, foram ainda identificados e quantificados mais doze ácidos gordos. Os AGPI foram o principal grupo de ácidos gordos no caso de *A. arvensis* e *L. giganteus*, enquanto que para *L. deliciosus*, *S. imbricatus* e *T. portentosum*, o grupo principal foi o dos AGMI. Para todos os cogumelos em estudo verificou-se que os ácidos gordos insaturados predominam sobre os ácidos gordos saturados.

**Tabela 2.** Composição em ácidos gordos (%) de cinco espécies de cogumelos silvestres comestíveis Portugueses (Média  $\pm$  s; n=3).

|      | Cogumelos          |                      |                     |                      |                       |
|------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
|      | <i>A. arvensis</i> | <i>L. deliciosus</i> | <i>L. giganteus</i> | <i>S. imbricatus</i> | <i>T. portentosum</i> |
| AGS  | 23,47 $\pm$ 0,06   | 40,14 $\pm$ 0,13     | 19,25 $\pm$ 0,02    | 18,08 $\pm$ 0,09     | 9,57 $\pm$ 0,02       |
| AGMI | 19,85 $\pm$ 1,48   | 42,28 $\pm$ 0,01     | 34,08 $\pm$ 0,46    | 46,20 $\pm$ 0,21     | 59,03 $\pm$ 0,03      |
| AGPI | 56,68 $\pm$ 1,42   | 17,59 $\pm$ 0,12     | 46,67 $\pm$ 0,47    | 35,73 $\pm$ 0,30     | 31,40 $\pm$ 0,05      |

Em relação à composição em açúcares, todos os cogumelos apresentaram manitol e trealose como principais açúcares. No caso de *A. arvensis*, *L. deliciosus* e *S. imbricatus*, o manitol foi o açúcar mais abundante (0,07 a 1,38 g/100 g de peso fresco), enquanto que no caso de *L. giganteus* (0,50 g/100 g) e *T. portentosum* (1,46 g/100 g) predominou a trealose. Com excepção de *A. arvensis*, outros açúcares para além de manitol e trealose, ou não foram detectados ou foram detectados em pequenas quantidades. Na Figura 1 apresentam-se alguns dos cromatogramas dos açúcares individuais obtidos neste estudo.



**Figura 1.** Cromatogramas dos açúcares individuais de *Sarcodon imbricatus* (a) e *Tricholoma portentosum* (b), 1- manitol; 2-trealose.

Em geral, a composição química e o valor energético obtidos para os cogumelos silvestres comestíveis Portugueses sugerem o seu enorme potencial como fontes alimentares de grande qualidade. As espécies analisadas constituem uma boa fonte de proteínas e hidratos de carbono, próxima de muito legumes e da carne, e provaram ser alimentos excelentes para utilização em dietas equilibradas devido ao baixo teor em gorduras e energia. No entanto, o elevado valor nutricional e sabor único destes cogumelos silvestres pode perder-se se não estiver bem documentado. Assim, torna-se imperativa a realização de uma base de dados nutricionais destes cogumelos para reter toda essa informação de forma a valorizar a conservação destes recursos naturais e dos habitats envolvidos.

#### Agradecimentos

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projecto de investigação POCI/AGR/56661/2004).

#### Referencias

- [1] W.M. Breene – J. Food Protect. **53** (1990) 883-894.
- [2] P. Manzi, L. Gambelli, S. Marconi, V. Vivanti, L. Pizzoferrato - Food Chem. **65** (1999) 477-482.
- [3] J.A. Maga - Agric. Food Chem. **29** (1981) 1-4.
- [4] P. Bobek, E. Ginter, M. Jurcovicova, K. Kunia - Ann. Nutr. Metab. **35** (1991) 191-195.
- [5] P. Bobek, S. Galbavy – Nahrung **45** (1999) 339-342.
- [6] I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, L. Barros – Food Chem. **100** (2007) 1511-1516.
- [7] L. Barros, M.-J. Ferreira, B. Queirós, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista - Food Chem. (2007) in press.
- [8] L. Barros, R.C. Calhella, J.A. Vaz, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, L.M. Estevinho - Eur. Food Res. Technol. (2006) in press.
- [9] H.Fink, K.W Hoppenhaus – Nutr. Abs. Rev. **28** (1958) Abs. 4886.
- [10] E.H. Gruen, M.W. Wong – Can.. J. Botany. **60** (1982) 1330-1341.
- [11] V.A. Diéz, A. Alvarez - Food Chem. **75** (2001) 417-422.
- [12] P. Manzi, S. Marconi, A. Aguzzi, L. Pizzoferrato - Food Chem. **84** (2004) 201-206.
- [13] A. Yildiz, M. Karakaplan, F. Aydin - Food Chem. **61** (1998) 127-130.
- [14] D. Agahar-Murugkar, G. Subbulakshmi - Food Chem. **89** (2005) 599-603.
- [15] V.A. Aletor - Food Chem. **54** (1995) 265-268.
- [16] A. Harada, S. Gisusi, S. Yoneyama, M. Aoyama - Food Chem. **84** (2004) 265-270.

# CONJUGATED LINOLENIC ACID: A BIOACTIVE COMPONENT IN *FLAMENGO* CHEESE

Martins, S.I.V.<sup>1</sup>; Alfaia, C.M.M.<sup>1</sup>; Lopes, P.A.<sup>1</sup>; Castro, M.L.F.<sup>2</sup> and Prates, J.A.M.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - CIISA, Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia - Centro de Estudos Farmacêuticos, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

\* tel. 213652890, fax. 213652895, japrates@fmv.utl.pt.

**Key-words:** conjugated linoleic acid; cheese; *flamengo* brands

**ABSTRACT:** Conjugated linoleic acid (CLA) is a group of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. CLA is synthesized in ruminants both from dietary linoleic acid in rumen, by the microbial flora, and from vaccenic acid in the tissues during de novo synthesis. Biological, physiological and nutritional properties have been attributed to CLA. Meat and dairy products supply considerable amounts of CLA, enhancing their nutritional value. *Flamengo* cheese is the most consumed Portuguese cheese, being Limiano, Terra Nostra and Agros the most sold brands. The following study reports the CLA content of these three cheeses. Specific CLA isomers were identified and quantified by using silver ion-high performance liquid chromatography (Ag+-HPLC). The major CLA isomer in dairy products was the cis-9,trans-11, followed by the trans-7,cis-9. As expected, these two isomers represent the majority of CLA content: 69.86 - 79.93% to cis-9,trans-11 and 12.99 - 20.18% to trans-7,cis-9, although total trans/trans and cis/trans isomers showed no significant differences among cheeses. Trans-10,cis-12, known as related to effects on lipid metabolism, only occurred in residual amounts in Agros cheese. In addition, Limiano presented the lowest values of specific (3.69 mg/g fat) and total (0.80 mg/g cheese) CLA content comparing to Agros and Terra Nostra (p<0.05). Differences among cheeses can be explained by different milk origin, start culture and process parameters on cheese manufacture. In summary, Limiano, Terra Nostra and Agros cheeses are good sources of CLA, specially cis-9,trans-11 isomer, which seems to be associated with several beneficial effects on human health.

## 1. INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid refers to a group of positional and geometric isomers of the omega-6 essential fatty acid linoleic acid (cis-9,cis-12, octadecadienoic acid). CLA is formed via linoleic acid isomerase enzyme activity generated by *Butyrivibrio fibrisolvens*, an endogenous bacteria found in the rumen of cattle and dairy cows [1]. Evidence also demonstrated the endogenous synthesis of CLA from trans-11, octadecadienoic acid occurs subsequent to bacterial delta-9 desaturase enzyme activity [2]. This biochemical pathway is responsible for the majority of CLA found in products generated from milk fat of lactating cows fed grain-based diets [2]. As a result of the isomerization and desaturation reactions in cattle, cis-9,trans-11 is the predominant naturally occurring CLA isomer in the human diet [4]. Nevertheless, a mixture of almost fifteen CLA isomers is present in dairy products and beef fat. CLA concentrations in dairy products typically range from 2.9 and 8.92 mg CLA/g fat, of which the cis-9,trans-11 isomer makes up between 73-93 percent of the total CLA [3].

Unlike linoleic acid, CLA is protective against cancer, atherosclerosis and diabetes in a variety of animal models [3]. Until now, the majority of research has been conducted on cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 isomers, the predominant isomers produced synthetically from vegetable oils. However, it appears that different isomers have different activities *in vivo* [3] and information concerning CLA composition in the human diet is of interest. Cheese is daily present in the Portuguese diet, with an annual consumption of approximately 10 kg per person [4]. Among all types of cheeses, *Flamengo* represents an intake of 49% [5]. Therefore, in the present work, CLA profile and quantification of each isomer was determined in Limiano, Terra Nostra and Agros, the three brands of *Flamengo* cheese most consumed in Portugal.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Fifteen samples of each cheese brand: Limiano, Terra Nostra and Agros, were purchased in a regular supermarket. Cheese fat was extracted according to Fritsche *et al.* [6]. Approximately 100 mg of cheese was weighted (in duplicate) and methylene chloride-methanol (4:1 v/v) was added three times, and a fourth extraction was performed with *n*-hexane. Total lipids were measured gravimetrically by weighting the fatty residue obtained after solvent evaporation. Fatty acids methyl esters were prepared by direct base-catalysed transesterification, with sodium methoxide during 2h at 30°C [7]. CLA isomers were individually separated by triple silver-ion columns in series (ChromSpher 5 Lipids, 250mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Chrompack, Bridgewater, NJ; USA), using a high performance liquid chromatography system (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc. Palo Alto, CA, USA) with 0.1 % acetonitrile in hexane as solvent at a flow rate of 1ml/min. The HPLC was equipped with autosampler and diode array detector (DAD) adjusted to 233 nm. Total and individual CLA isomer contents were determined based on the external standard technique and on the method of area normalization [8].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

In table 1 are reported the CLA values for the three analyzed cheeses. The total CLA content ranged between 0.80 and 1.30 mg/g cheese, in Limiano and Terra Nostra, respectively. Limiano presents the lowest value of specific CLA content, 3.69 mg/g fat, comparing to Agros and Terra Nostra ( $p < 0.05$ ). CLA contents were comparable to those published in previous studies, where the CLA content in different cheeses varied from 2.8 mg/g fat in Cheddar [9] to 7.1 mg/g fat in Swedish hard cheeses [10]. It has been suggested that CLA is formed on heating during the manufacture of processed cheese [11]. In addition, because CLA is produced from rumen microorganisms, the activity of starter cultures might be another factor contributing to the variation of CLA in dairy products [12]. However, Gnadig *et al.* [13] did not observe variations on the CLA content and isomers composition during Emmental cheese manufacturing process. The major CLA isomer was cis-9,trans-11 (69.86 - 79.93%), followed by the trans-7,cis-9 (12.99 - 20.18%). Other important isomers were trans-11,trans-13, trans-10,trans-12, trans-9,trans-11 and trans-11,cis-13 (table 1). Trans-10,cis-12, known as related to effects on lipid metabolism, only occurs in residual amounts in Agros cheese. Limiano showed, statistically, smaller amounts of trans-12,trans-14, trans-11,trans-13, cis-9,trans-11 and trans-11,cis-13. Although, total trans/trans and cis/trans isomers showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) among cheeses.

#### 4. CONCLUSIONS

By Ag+-HPLC technique, a total of 13 CLA isomers were identified in Portuguese *Flamengo* cheeses, being the most predominant cis-9,trans-11. Although all cheeses are good sources of cis-9,trans-11 isomer, Agros and Terra Nostra cheeses seem to have higher contents of this bioactive component.

#### Acknowledgements

Individual fellowships (SFRH/BD/2005/22566 to Susana Martins and SFRH/BPD/2005/23931 to Paula Lopes) and financial support (POCTI/CVT/2002/44750 and CIISA/2002/52) are acknowledged.

#### References

- [1] - C.R. Kepler, W.P. Tucker, S.B. Tove - *J. Biol. Chem.* **241** (1966) 1350
- [2] - J.M. Griinari, B.A. Corl, S.H. Lacy - *J. Nutr.* **130** (2000) 2285
- [3] - H.B. MacDonald - *J. Am. Coll. Nutr.* **19** (2000) 111S
- [4] - *Estatísticas Agrícolas*, Instituto Nacional de Estatística, Lisboa (2003)
- [5] - *Anuário FOOD*, AcNielsen (2003)
- [6] - J. Fritsche, S. Fritsche, M.B. Solomon, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, K. Morehouse, Y. Ku - *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102** (2000) 667
- [7] - Y. Park, K.J. Albright, Z.Y. Cai, M.W. Pariza - *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 1158
- [8] - AOAC 963.22 in *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MA, USA, Association of Official Analytical Chemists International (2000) 24
- [9] - H. Lin, T. Boylston, L. Luedecke, T. Shultz - *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 801
- [10] - J. Jiang, L. Bjorck, R. Fonden - *Int. Dairy J.* **7** (1997) 863
- [11] - N.C. Shantha, E.A. Decker, Z. Ustunol - *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (1992) 425
- [12] - H. Lin, T.D. Boyston, J. Chang, L.O. Luedecke, T.D. Shultz - *J. Dairy Sci.* **78** (1995) 2358
- [13] - S. Gnadig, J-F. Chamba, E. Perreard, S. Chappaz, J-M. Chardigny, R. Rickert, H. Steinhart, J-L. Sébédio - *J. Dairy Res.* **71** (2004) 367

**Table 1.** Total (mg/g cheese) and specific (mg/g fat) CLA contents, and isomeric composition (% of total CLA) in Portuguese *Flamengo* cheeses.

|                         | <b>Agros</b>                   | <b>Limiano</b>                  | <b>Terra Nostra</b>             |                                 |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Total content</b>    | <b>1.18 ± 0.33<sup>a</sup></b> | <b>0.80 ± 0.09<sup>b</sup></b>  | <b>1.30 ± 0.22<sup>a</sup></b>  |                                 |
| <b>Specific content</b> | <b>5.19 ± 1.74<sup>a</sup></b> | <b>3.69 ± 0.31<sup>b</sup></b>  | <b>5.92 ± 0.80<sup>a</sup></b>  |                                 |
| <b>CLA isomers</b>      | trans12,trans14                | 1.10 ± 0.44 <sup>a</sup>        | 0.62 ± 0.04 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | trans11,trans13                | 2.73 ± 1.14 <sup>a</sup>        | 1.73 ± 0.30 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | trans10,trans12                | 1.16 ± 0.46 <sup>a</sup>        | 1.43 ± 0.43 <sup>a</sup>        |                                 |
|                         | trans9,trans11                 | 1.40 ± 0.28 <sup>a</sup>        | 1.84 ± 0.08 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | trans8,trans10                 | 0.66 ± 0.36 <sup>a</sup>        | 1.01 ± 0.17 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | trans7,trans9                  | 0.72 ± 0.26 <sup>a</sup>        | 1.03 ± 0.12 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | trans6,trans8                  | 0.28 ± 0.23 <sup>a</sup>        | 0.50 ± 0.11 <sup>b</sup>        |                                 |
|                         | <b>Total trans,trans</b>       | <b>8.06 ± 0.52<sup>a</sup></b>  | <b>8.16 ± 0.36<sup>a</sup></b>  | <b>7.84 ± 0.66<sup>a</sup></b>  |
|                         | cis/trans12,14                 | n.d.                            | n.d.                            | n.d.                            |
|                         | trans11,cis13                  | 2.43 ± 1.00 <sup>a</sup>        | 1.79 ± 0.86 <sup>a</sup>        | 2.17 ± 0.25 <sup>a</sup>        |
|                         | cis11,trans13                  | 0.24 ± 0.22 <sup>a</sup>        | n.d.                            | 0.07 ± 0.10 <sup>b</sup>        |
|                         | trans10,cis12                  | 0.04 ± 0.17                     | n.d.                            | n.d.                            |
|                         | cis9,trans11                   | 74.32 ± 5.26 <sup>a</sup>       | 69.86 ± 4.69 <sup>b</sup>       | 76.93 ± 3.30 <sup>a</sup>       |
|                         | trans7,cis9*                   | 14.92 ± 5.89 <sup>a</sup>       | 20.18 ± 5.73 <sup>b</sup>       | 12.99 ± 3.19 <sup>a</sup>       |
|                         | <b>Total cis/trans</b>         | <b>91.94 ± 0.52<sup>a</sup></b> | <b>91.84 ± 0.36<sup>a</sup></b> | <b>92.16 ± 0.66<sup>a</sup></b> |
|                         | <b>Total cis/cis</b>           | <b>n.d.</b>                     | <b>n.d.</b>                     | <b>n.d.</b>                     |

\* This CLA isomer co-eluted with minor amounts of the trans8,cis10 isomer;

n.d.= not detected;

<sup>(a, b)</sup> Rows with different superscript letters are significantly different (p<0.05), by Tukey's test.

# DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM VINHOS TINTOS ANTES E DEPOIS DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA

*Cabrita, M.J.; Torres, M.; Palma, V.; Costa Freitas, A.M.*

Departamento de Fitotecnia, Instituto de Ciência Agrárias Mediterrânicas – ICAM, Universidade de Évora, Apto. 94, 7002-554 Évora, Portugal

**Palavras chave:** compostos não flavonoides, vinhos varietais tintos, fermentação malolactica

**Resumo:** O objectivo deste trabalho é avaliar o teor em compostos fenólicos de baixo peso molecular de vinhos tintos de seis castas diferentes: Trincadeira, Aragonéz, Cabernet Sauvignon, Castelão, Alforcheiro e Touriga Nacional. Para tal, em dois anos consecutivos foram recolhidas amostras antes e depois da fermentação maloláctica em vinhos elementares destas castas produzidos na adegas experimental da Universidade de Évora.

As amostras de vinho foram submetidas a uma extracção líquido-líquido com éter dietílico e os extractos obtidos foram injectados num cromatografo HP 1050 equipado com um detector de diodo array HP 1100. Efectuou-se uma separação por gradiente com dois solventes (A - H<sub>2</sub>O : ácido acético (98:2 v/v); B - H<sub>2</sub>O : metanol : ácido acético (68:30:2 v/v)), em coluna Superpher® RP 100, C18 (5 µm, 250mm x 4,6mm i.d.) (Merck, Germany), com detecção a 280, 320 e 254nm.

Os resultados mostram que durante a fermentação malolactica são os ácidos hidroxicinâmicos esterificados com o ácido tartárico, os ácidos caftárico, fertárico e coutárico, que podem sofrer maiores alterações transformando-se em ácidos hidroxicinâmicos livres, ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico. Os restantes compostos fenólicos de baixo peso moléculas não sofrem grandes alterações por acção do metabolismo das bactérias lácticas. Os diferentes vinhos apresentam diferentes perfis em ácidos fenólicos de baixo peso moléculas.

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação maloláctica em vinhos tintos é um processo de desacidificação levado a cabo por bactérias lácticas. Se o impacto da fermentação maloláctica no aroma dos vinhos [1,2,3,4] ou na produção de carbamato de etilo [5,6] têm sido bastante estudados já o mesmo não se pode dizer em relação aos compostos fenólicos, havendo poucos trabalhos sobre este tema [7].

Os compostos fenólicos são geralmente divididos em compostos fenólicos flavonoides e não flavonoides. Os compostos fenólicos não flavonoides podem-se dividir em monofenólicos e em polifenólicos consoante possuam um ou mais anéis benzénicos no seu esqueleto estrutural. Nos vinhos os principais compostos fenólicos não flavonoides são ácidos e aldeídos fenólicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), ácidos hidroxicinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) e estilbenos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Estes compostos fenólicos não flavonoides têm origem em duas vias metabólicas distintas na planta: a via do ácido shiquimico que origina directamente compostos com esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> e a via do poliacetato que dá origem por exemplo aos ácidos fenólicos [8].

Os principais ácidos fenólicos existentes nos vinhos podem ser derivados do ácido benzóico (ácido gálico, siringico, vanílico, protocatequico e gentísico) ou do ácido cinâmico (ácidos ferulico, *p*-coumárico e cafeico). Estes últimos encontram-se nas uvas esterificados com o ácido tartárico dando origem a esteres tartáricos dos ácidos cinâmicos (ácido fertárico, coutárico e caftárico). De entre os aldeídos fenólicos destaca-se o aldeído protocatequico.

Recentes investigações esclareceram a importância da fermentação maloláctica sobre estes compostos. Em estudos independentes Hernández e colaboradores [7] e Cabrita e colaboradores [9] concluíram que por efeito do metabolismo das bactérias lácticas os ácidos

hidroxicinamil tartáricos dão origem aos respectivos ácidos fenólicos da série cinâmica livres. Assim o ácido caftarico, fertárico e coutárico quase desaparecem durante a fermentação malolactica, observando-se no final da mesma teores mais elevados de ácidos cafeico, ferulico e p-cumárico.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Ensaio de vinificação**

Os vinhos foram elaborados na adega experimental da herdade da Mitra da Universidade de Évora, nos anos de 2005 e 2006, com uvas provenientes da Vinha Nova da mesma herdade. As castas utilizadas foram: Trincadeira, Aragonez, Cabernet Sauvignon, Alforcheiro, Castelão e Touriga Nacional. As amostras foram recolhidas no final da fermentação alcoólica e no final da fermentação malolactica, que foi determinado por cromatografia em papel.

### **2.2. Métodos analíticos**

Reagentes e padrões: Água de qualidade Milli Q (Millipore, Bedford,MA), éter dietílico p.a. e metanol Licrosolv da Merck (Darmstadt, Germany). Os solventes para HPLC foram filtrados (filtros Supor e Nylaflo, Gelman) e desgaseificados antes da sua utilização. Os compostos fenólicos, ácido gálico, ácido gentísico, ácido protocatéuico, protocateuico aldeído, ácido siríngico, ácido vanílico e ácido ferulico foram adquiridos a Extrasynthese (Genay, France). Os ácidos cafeico e p-coumárico foram adquiridos a Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Extracção dos ácidos fenólicos: 20 mL de vinho foram acidificados a pH 2 com HCL concentrado. A 5 mL deste vinho foram adicionados duas vezes 5 mL de éter dietílico (10 minutos com agitação). Recolheu-se a fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente sob corrente de azoto. O residuo seco obtido foi recuperado com 1 mL de metanol/água (1:1), filtrado por uma membrana Nylaflo (Gelman) com poro de 0,45 µm

Condições cromatográficas: Os extracto foram separados num cromatografo de fase liquida Hewlett Packard serie 1050, equipado com uma ansa de 20 µL, uma bomba quaternária e um detector de diodos HP serie 1100. Os dados foram obtidos e tratados com o software Chemstation da HP. A coluna utilizada foi uma RP Superpher® 100, C18 (5 µm packing, 250mm x 4,6mm i.d.) (Merck, Germany) com pré coluna do mesmo material. O fluxo foi de 1 mL/ min. Os solventes usados foram: solvente A água : ácido acético (98:2 v/v), sovente B água : metanol : ácido acético (68:30:2 v/v) e o solvente C era metanol. O gradiente usado foi: solvente A de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocratico durante 9 minutos; de 23% a 5% (5 min); de 5% a 0% (3 min); isocratico durante 5 minutos, e post-run de 5 minutos para re-equilibrar o gradiente inicial. A detecção efectuou-se a 280nm, 254nm e 320nm e registaram-se os espectros UV/Vis (varrimento de 190 a 400nm) para todos os picos.

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos para os padrões. A quantificação foi feita pelo método do padrão externo. Os ácidos caftarico coutárico e fertárico foram doseados como ácidos cafeico, p-coumárico e ferulico, mas foi feito o seu isolamento a partir de vinho segundo [10] Singleton *et al.* (1978) para ajudar na sua identificação Todas as amostras foram feitas em duplicado.

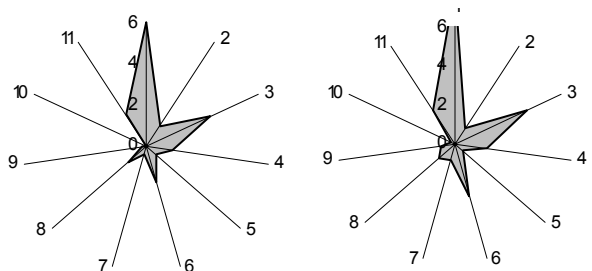
## **3.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na figura 1 apresentam-se os perfis das várias castas em estudo para as amostras recolhidas nos dois anos consecutivos, antes e depois da fermentação malolactica. A sua observação mostra que, excluindo diferenças quantitativas, os perfis são semelhantes para os vinhos do dois anos consecutivos, mas revelam-se diferentes antes e depois da fermentação maloláctica.

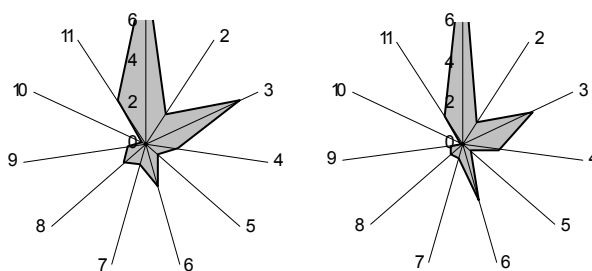


As castas mais ricas na globalidade destes compostos são o Alfrocheiro e a Touriga Nacional e a mais pobre é a casta Trincadeira.

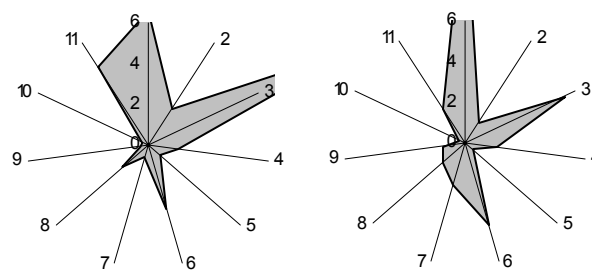
Por acção do metabolismo das bactérias lácticas verifica-se: os teores em ácido gálico, ácido siríngico, ácido protocatéuico e ácido vanílico têm tendência a aumentar; os teores de ácido caftárico, coutárico e fertárico têm tendência a diminuir, e nos casos em que isto acontece verifica-se um aumento de ácido cafeíco, p-cumárico e ferulico.



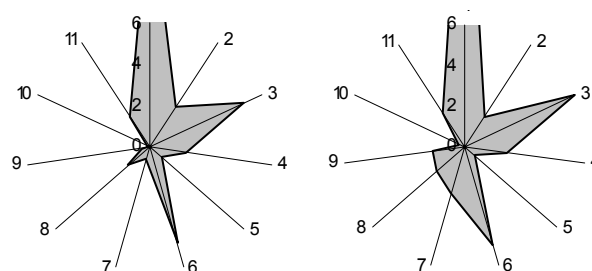
Trincadeira: antes da FML em 2005 e 2006;



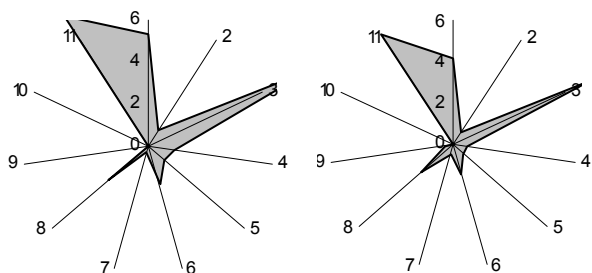
Trincadeira: depois da FML em 2005 e 2006



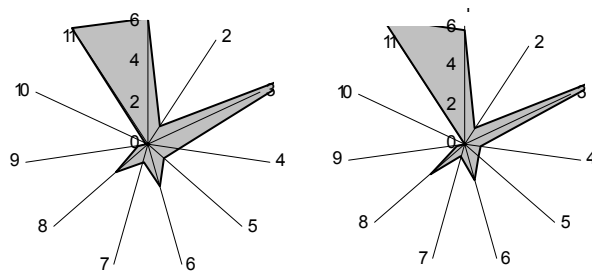
Cabernet Sauvignon: antes da FML em 2005 e 2006



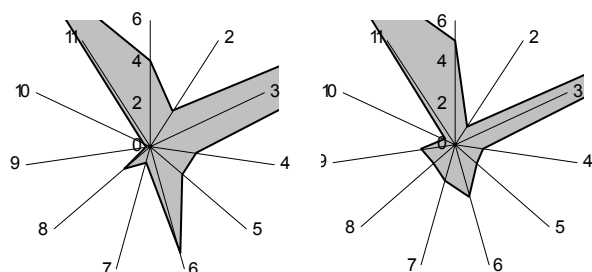
Cabernet Sauvignon: depois da FML em 2005 e 2006



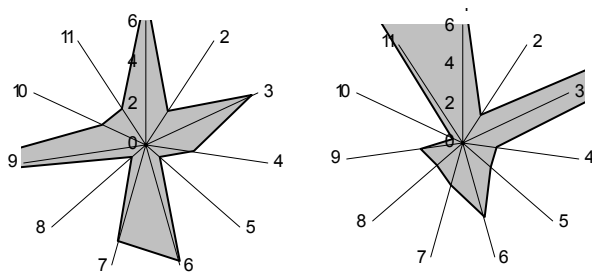
Aragonez: antes da FML em 2005 e 2006



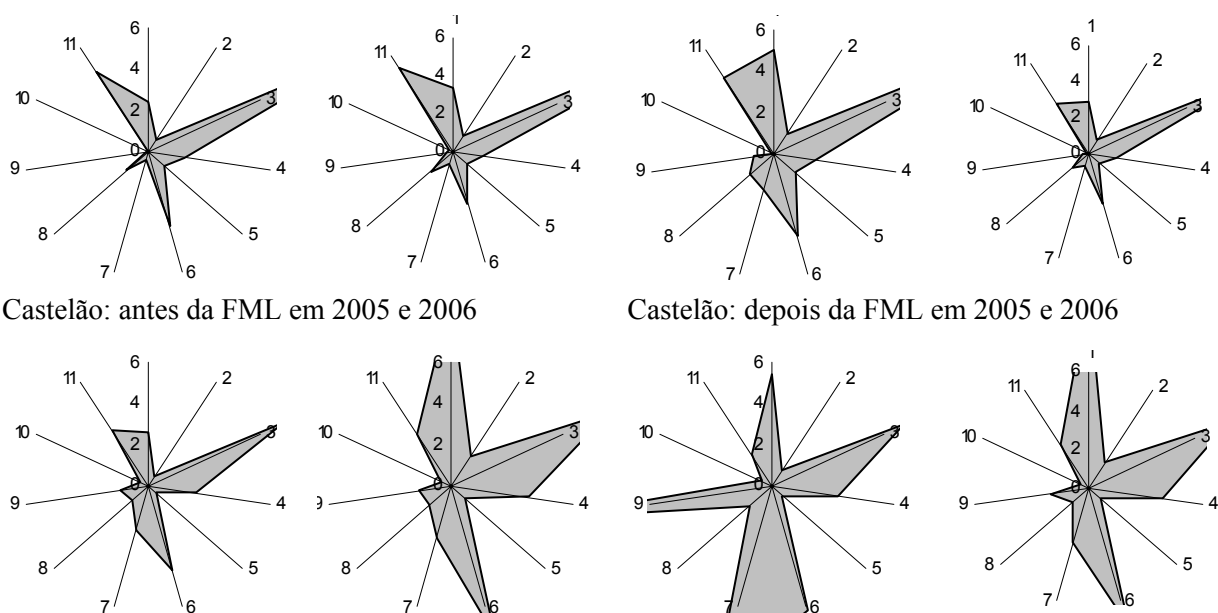
Aragonez: depois da FML em 2005 e 2006



Touriga nacional: antes da FML em 2005 e 2006



Touriga nacional: depois da FML em 2005 e 2006



Castelão: antes da FML em 2005 e 2006

Castelão: depois da FML em 2005 e 2006

Alforcheiro: antes da FML em 2005 e 2006

Alforcheiro: depois da FML em 2005 e 2006

Figura 1 – perfis dos compostos fenólicos nos vinhos antes e depois da fermentação maloláctica nos anos de 2005 e 2006

Legenda: 1 – ácido gálico; 2 – ácido protocatéuico; 3 – ácido caftárico; 4 – ácido vanílico; 5 – ácido fertárico; 6 – ácido siríngico; 7 – ácido cafeíco; 8 – aldeído protocatéuico; 9 – ácido p-cumárico; 10 – ácido ferulíco; 11 – ácido coutárico

## 5.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D' Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P., and Henschke, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* **21**, 257-265.
- [2] de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4003-4008.
- [3] Fernandes, L., Relva, A. M., Gomes da Silva, M. D. R., and Costa Freitas, A. M. (2003). Different multidimensional chromatographic approaches applied to the study of wine malolactic fermentation. *Journal of Chromatography A* **995**, 161-169.
- [4] Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* **32**, 491-496.
- [5] Mira de Ordun, R., Liu, S.-Q., Patchett, M. L., and Pilone, G. L. (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **183**, 31-35.
- [6] Uthurry, C. A., Suárez Lepe, J. A., Lombardero, J., and García Del Hierro, J. R. (2006). Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry* **94**, 262-270.
- [7] Hernández, T.; Estrella, I.; Carlavilla, D.; Martín-Alvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. (2006) Phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeasts, *Arch Microbiol.*, 146, 96-98
- [8] Harborne, J.B.; Williams, C.A.(2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**:481-504
- [9] Cabrita, M.J.; Torres, M.; Costa Freitas, A.M. (2006) Controlling Wine Malolactic Fermentation: Low Molecular Weight Phenolic Compounds, *29th International Symposium on Capillary Chromatography*, de 29 de Maio a 2 de Junho, Riva del Garda, Itália
- [10] Singleton, V. L., Timberlake, C. F., and Lea, A. G. H. (1978). The phenolic cinnamate of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.* **29**, 403-410.

# DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM AZEITONAS POR QUECHERS E GC/MS

*Cunha, S.C.<sup>1\*</sup>, Lehotay, S.J.<sup>2</sup>, Maštovská, K.<sup>2</sup>, Fernandes, J.O.<sup>1</sup>, Oliveira, M.B.P.P.<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto. R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030-Porto

<sup>2</sup> United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center; 600 East Mermaid Lane; Wyndmoor, Pennsylvania, 19038; USA

Tel +351-222078927 Fax +351-222003977 e-mail: sara.cunha@ff.up.pt

**Palavras-chave:** Azeitonas, multiresíduos de pesticidas, QuEChERS; DSI-GC/MS

**Resumo:** QuEChERS, sigla em inglês para quick (rápido), easy (fácil), cheap (económico), effective (eficiente), rugged (robusto), e safe (seguro), corresponde a um processo de preparação de amostras que acoplado com a cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) permite a detecção e quantificação de centenas de resíduos de pesticidas, com elevada exactidão qualitativa e quantitativa [desde <10 ng/g (ppb)] nas mais variadas matrizes alimentares [1]. Envolve basicamente 3 passos principais: 1) homogeneização de cerca de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrilo, 6 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e 1,5 g de cloreto de sódio; 2) purificação de uma alíquota da mistura obtida por dispersão em fase sólida com MgSO<sub>4</sub>/N-propil-etilenodiamina (PSA) e consequente homogeneização; e 3) centrifugação da mistura e transferência do sobrenadante para frascos apropriados para análise por GC-MS

Neste trabalho apresentam-se os resultados da optimização do método para a análise de pesticidas em azeitonas. A optimização envolveu a avaliação da influência da composição da amostra (teor de água e teor de gordura) e de adsorventes diferentes (PSA, carvão preto activado-GCB e octadecilsilil-C18) na recuperação de 13 resíduos de pesticidas.

O método foi validado através de ensaios de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade em matriz, para gama de concentrações muito inferiores aos limites máximos de resíduos (LMRs) estipulados por legislação para os pesticidas em estudo. Os resultados obtidos demonstram que o método permite obter bons valores de recuperação (70-109%), com desvios padrão relativos <20% para todos os pesticidas em estudo.

## 1. INTRODUÇÃO

A olivicultura em Portugal, como em outros países mediterrâneos, tem vindo a sofrer nas últimas décadas profundas modificações, na procura de soluções para problemas de produção e para a melhoria da qualidade do azeite.

Um dos procedimentos mais comuns é a aplicação de pesticidas. Actualmente, a União Europeia permite a utilização de mais de 200 substâncias activas, para o controlo de pragas, doenças e infestantes em azeitonas destinadas à produção de azeite [2]. No entanto, a problemática das actuais barreiras alfandegárias e fitossanitárias em todo o mundo, exige um controlo cada vez mais rigoroso no sentido de identificar-se e quantificar-se correctamente os resíduos de pesticidas presentes nos alimentos, bem como a comprovação da ausência de pesticidas proibidos para a cultura.

Neste sentido o objectivo do nosso trabalho foi o optimizar uma metodologia capaz de permitir analisar os resíduos de alguns pesticidas, nomeadamente aqueles que têm uma ampla utilização no controlo fitossanitário de olivais. Devido à complexidade da matriz, optou-se por optimizar o método QuEChERS [1], que tem sido aplicado com sucesso na análise de multiresíduos de pesticidas em diversas matrizes alimentares.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Preparação da Amostra

Num tubo de Teflon® de 50 ml pesou-se uma amostra de 10 g de polpa, previamente homogeneizada, e adicionou-se 10 ml de acetonitrilo, 4 g MgSO<sub>4</sub> anidro e 1 g NaCl. De seguida, misturou-se a amostra manualmente e de forma vigorosa durante 1 min e centrifugou-se a 3500 g durante 1 min. Procedeu-se então à purificação da seguinte forma: a 1 ml da solução centrifugada adicionou-se 150 mg de MgSO<sub>4</sub> anidro, 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 50 mg de carvão preto activado, de seguida agitou-se durante 20 s em vortex e centrifugou-se a 3500 g durante 1 min. Transferiu-se 400 µl do extracto para um micro-frasco de vidro e adicionou-se 25 µl de uma solução de padrão interno trifenilfosfato em acetonitrilo com 1,6% de ácido fórmico a 16 mg/l. Antes da injeção adicionou-se ao extracto 20 µl de uma solução de “protectores analíticos” (3-etoxi-1,2-propanediol, D-sorbitol, L- ácido gulónico-lactona a 10:1:1 mg/ml em acetonitrilo) e transferiu-se a solução para micro-tubos de vidro de forma a assegurar a correcta injeção através do injector DSI automático.

### 2.2. Condições Cromatográficas

As substâncias foram analisadas por um aparelho de cromatografia gasosa provido de um sistema de injeção automático Combi-PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) com um DSI automático de 2ª geração em união com um Optic 3 PTV (Atas-GL International BV, Veldhoven, Holanda) e associado a um detector selectivo de massa. As condições analíticas foram baseadas no método optimizado por Cunha *et al.* [3]; de forma sucinta usou-se:

**Aparelho:** Cromatógrafo gasoso HP GC-5890 (Agilent, Little Falls, DE, Estados Unidos).

**Injeção em modo de fluxo e temperatura programado:**

Temperatura inicial de 100 °C, mantida durante 3,5 min com “split” rácio de 50:1, segue-se incremento de 5 °C/min, até 280 °C, com “splitless” durante 3,5 min, mantém-se constante a 280 °C, com “split” 50:1 durante 2 min, para decrescer a seguir a 20 °C/min, até 150 °C, com “split” 20:1 e assim se manter até ao final da corrida.

**Coluna:** FactorFour VF-5 EZ (Varian, Palo Alto, CA, Estados Unidos) 30 m x 0,25-mm i.d., 0,25-mm espessura de filme.

**Temperaturas do Forno:**

Inicial a 80 °C, mantida durante 3,5 min segue-se um incremento de 10 °C/min, até 230 °C e um incremento de 45 °C/min, até 300 °C, no final mantém-se 300 °C durante 10 min.

**Fluxo:** Hélio 1 ml/min

**Volume de injeção:** 10 µl

**Detector:** Espectrómetro de massa HP MSD-5972B (modo SIM)

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. -Desenvolvimento do Método Analítico

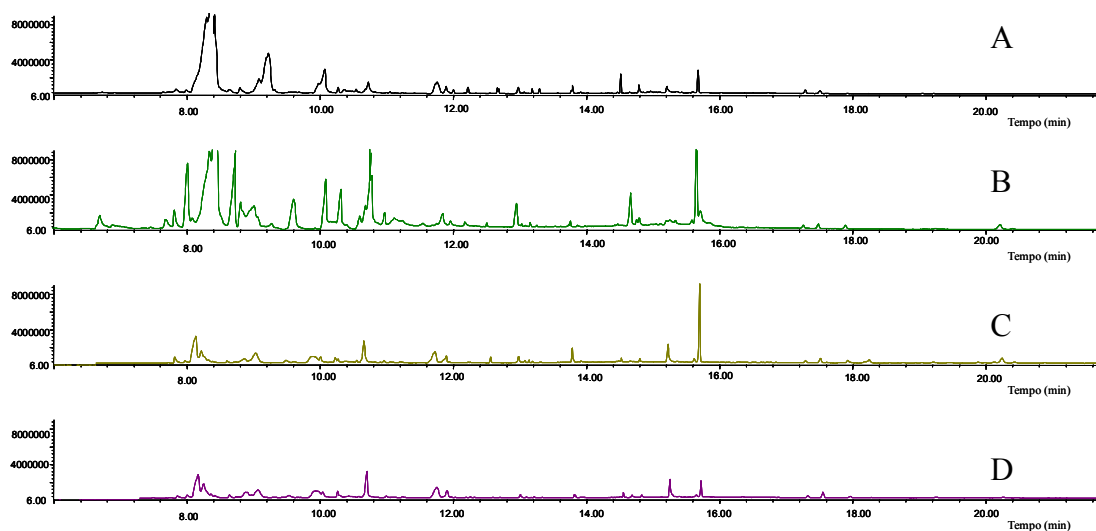
Tendo como ponto de partida o processo de QuEChERS, nomeadamente no que respeita às condições de extracção propostas (acetonitrilo adicionado de MgSO<sub>4</sub> anidro e NaCl), desenvolveu-se trabalho experimental no sentido de adaptar este método a azeitonas da cultivar Cobrançosa, para a análise de dimetoato, da simazina, do diazinão, do carbaril, do fentião, do metidatião, da napropamida, do p,p'-DDE, do oxifluorfenol, da carfentrazona-etil,

do fosmete, do piriproxifeno e da deltametrina em níveis inferiores aos LMRs estabelecido por legislação.

A etapa alvo de experiência foi a purificação tendo sido verificada a influência de diferentes adsorventes e a influência do teor de gordura na análise.

### a) Purificação

Diversos adsorventes foram testados na purificação dos extractos de azeitonas obtidos após extracção QuEChERS. Os resultados são apresentados na Figura 1 .



**Figura 1** - Cromatogramas, em modo de varrimento total de extractos de azeitonas com diferentes adsorventes: (A) sem purificação; (B) MgSO<sub>4</sub>+PSA; (C) MgSO<sub>4</sub>+PSA+GCB; (D) MgSO<sub>4</sub>+PSA+GCB+C18.

Como a Figura 1. atesta, a utilização da mistura MgSO<sub>4</sub> anidro, PSA, GCB e C18 permitiu assegurar resultados cromatográficos de boa qualidade, resultantes de extractos caracterizados pela sua limpidez. Verificou-se, no entanto, uma ligeira diminuição da resposta analítica, em especial para as substâncias mais polares.

### b) Teor de gordura

O processo de extracção e purificação otimizado foi aplicado em amostras com diferentes teores de gordura (entre 1 e 6 g de azeite para 10 g de amostra total). Os resultados obtidos permitiram concluir que independentemente da quantidade de gordura inicial apenas restavam cerca de 1,8% ± 0,3% de co-extractivos antes da purificação em 10 ml de acetonitrilo e 0,8% ± 0,2% de co-extractivos após purificação, o que atesta a eficiência do processo seleccionado.

## 3.2. Parâmetros de Validação do Método

As curvas de calibração foram obtidas de soluções padrão em amostra. O intervalo de concentrações escolhido abrangeu a gama de quantidades esperadas nas amostras a analisar. Os coeficientes de correlação obtidos foram usualmente superiores a 0,9900. Para estudar as recuperações e a precisão do método efectuaram-se seis determinações independentes em amostras branco adicionadas de padrões com três níveis de concentração. Os coeficientes de variação obtidos foram usualmente inferiores a 20% e os valores de recuperação variaram

entre os 70 e 109%, para as substâncias em estudo. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Recuperação (%) e precisão (coeficiente de variação %) obtido em amostras de azeitonas adicionadas de diferentes concentrações de padrões por análise com DSI-GC/MS (n=6). Os teores a sublinhado encontram-se fora do limite de 70-110% recomendado pela SANCO/10232/2006.

| Pesticida          | 1x Teor<br>adicionado<br>(µg/g) | 1x Teor<br>adicionado | 5x Teor<br>adicionado | 25 x Teor<br>adicionado | Média   |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------|
| Dimetoato          | 0,01                            | <LQ                   | 94 (3)                | <u>69</u> (5)           | 72 (10) |
| Simazina           | 0,10                            | <LQ                   | 71 (2)                | 96 (4)                  | 84 (16) |
| Carbaril           | 0,20                            | 90 (5)                | 88 (3)                | <u>69</u> (9)           | 82 (13) |
| Diazinão           | 0,02                            | <LQ                   | 98 (12)               | 97 (11)                 | 98 (17) |
| Fentião            | 0,10                            | 109 (13)              | 82 (6)                | 73 (18)                 | 88 (23) |
| Metidatião         | 0,05                            | <LQ                   | 70 (3)                | 86 (12)                 | 78 (15) |
| Napropamida        | 0,05                            | 76 (19)               | 80 (3)                | 82 (6)                  | 79 (12) |
| p,p'-DDE           | 0,01                            | 99 (15)               | 72 (5)                | 74 (6)                  | 82 (21) |
| Oxifluorfeno       | 0,01                            | 100 (7)               | 77(5)                 | 80 (5)                  | 86 (14) |
| Carfentrazona-etil | 0,05                            | 93 (10)               | 79 (7)                | 82 (5)                  | 85 (11) |
| Fosmete            | 0,10                            | <LQ                   | 96 (16)               | 88 (17)                 | 92 (19) |
| Piriproxifeno      | 0,05                            | 95 (3)                | 84 (5)                | 84 (6)                  | 88 (8)  |
| Deltametrina       | 0,10                            | 97 (13)               | 75 (15)               | 74 (8)                  | 82 (19) |

#### 4. CONCLUSÕES

Considerando os bons resultados obtidos nos ensaios de validação efectuados, nomeadamente no que respeita à linearidade e aos níveis de precisão e de recuperação, é possível propor a aplicação generalizada do método otimizado à análise de multiresíduos de pesticidas neste tipo de amostras.

#### Referências

- [1] S.J. Lehotay, “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues*” in *Methods in Biotechnology*, Vol. 19, Pesticide Protocols, Martinez Vidal, J.L. and Garrido Frenich, A. (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, (2005), pp. 239-261.
- [2] Decreto de Lei 123/2006 de 28.06. *Estabelece novos limites máximos de resíduos de substâncias activas de produtos fitofarmacêuticos permitidos nos produtos agrícolas de origem vegetal.*
- [3] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovska, J.O. Fernandes, M.B. P.P. Oliveira *Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives*, em publicação no *J. Sep. Sci.*

#### Agradecimentos

Cunha, Sara C. agradece ao Subprograma Ciência e Tecnologia do 3º Quadro Comunitário de Apoio (BD 8822/2002) e à Acção 8.1. do PO AGRO N° 482

# **DETERMINAÇÃO DE VITAMINA C. COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS EXTRACTIVOS EM VÁRIAS MATRIZES DE FRUTOS**

*Campos, G.; Vital, A.*

Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial (INETI), Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares (DTIA), Estrada do PAÇO DO Lumiar, n° 22, 1649-038 Lisboa

A vitamina C ou ácido ascórbico tem um papel fundamental no bom funcionamento do nosso organismo. Além de prevenir o escorbuto, a sua presença é indispensável em muitos mecanismos homeostáticos, onde promove reações de oxido-redução. São exemplos da sua importância o papel que esta vitamina desempenha nos metabolismos do colagénio, da creatina, da histidina, do ferro, de algumas hormonas e na destruição de radicais livres.

Na natureza, a vitamina C encontra-se sobretudo nos frutos e vegetais frescos. No entanto, estes alimentos, quando processados, podem sofrer grandes reduções do teor de vitamina C, devido à baixa estabilidade desta vitamina, que é muito oxidável e sensível ao calor e à luz.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a influência do processo de preparação da amostra, nos teores determinados para a vitamina C. O desenho experimental contemplou 3 matrizes com diferentes teores de vitamina C e 3 métodos para a sua extração e solubilização.

O método utilizado na quantificação - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) - foi por nós validado tendo, no caso dos frutos, como LD e LQ os valores 4mg/kg e 12mg/kg, respectivamente.

Os resultados obtidos evidenciam a existência de diferenças significativas nos teores de vitamina C, em função do método extractivo usado na preparação da amostra, o que identifica este passo como um ponto crítico na determinação do teor de vitamina C. Especial cuidado deve ser tomado quando são comparados valores, obtidos por métodos cujos processos extractivos não são igualmente eficientes.

## DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS VESTIGIAIS E ULTRA-VESTIGIAIS NO VINHO VERDE POR ICP-MS

*Almeida<sup>1\*</sup>, A.A.; Lopes<sup>1</sup>, C.M.P.V.; Andrade<sup>2</sup>, M.H.A.T.; Tuna<sup>2</sup>, J.M.F.*

<sup>1</sup>REQUIMTE, Serviço de Química-Física, Faculdade de Farmácia UPORTO, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal. \*E-mail: [aalmeida@ff.up.pt](mailto:aalmeida@ff.up.pt). <sup>2</sup>Alunos da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia UPORTO.

O conhecimento dos teores de elementos vestigiais e ultra-vestigiais no vinho, em particular de diversos elementos metálicos e metalóides, é importante de várias perspectivas: i) numa perspectiva enológica – porque vários metais (Al, Zn, Fe e Cu, nomeadamente) afectam as características organolépticas do vinho; ii) numa perspectiva nutricional – porque aquele conhecimento contribui para definir o significado da ingestão de vinho em termos de aporte ao organismo de elementos essenciais; iii) numa perspectiva toxicológica – porque diversos elementos tóxicos podem encontrar-se como contaminantes do vinho, existindo inclusive, em muitos casos, legislação que limita a sua presença (Pb, Cd, Hg, As, etc.); iv) e, até mesmo, numa perspectiva de verificação de autenticidade e de determinação da região de origem – existindo forte evidência de que o teor em elementos vestigiais, e em particular o teor de lantanídeos e certas relações isotópicas, podem ser uma indicação valiosa, talvez mesmo a mais valiosa, no sentido de se determinar a região de origem dos vinhos.

Neste trabalho apresentam-se os resultados da determinação de diversos elementos vestigiais e ultra-vestigiais (Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Li, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Pb, Rb, Sr, Tl, V, Zn) em amostras (n = 50) de vinho verde. Para o efeito, recorreu-se à técnica de ICP-MS (*inductively coupled plasma – mass spectrometry*), uma técnica instrumental relativamente recente, de grande utilidade, porque viabiliza a análise multi-elementar com muito baixos limites de detecção de um modo bastante rápido e expedito. Os resultados são comparados com os descritos na literatura para outros tipos de vinho.



# DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLÚOR EM BEBIDAS: CHÁS E REFRIGERANTES

Costa, B.<sup>1</sup>; Santos, C.<sup>1</sup>; Leite, H.<sup>1</sup>; Sousa, J.R.<sup>1</sup>; Santos, M.<sup>1</sup>; Couto, C.M.C.M.<sup>1,2\*</sup>; Pinto, I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ISCS- Norte- Rua Central da Gandra-1317, Gandra, Paredes, Portugal

<sup>2</sup>REQUIMTE, Departamento Química-Física, Faculdade de Farmácia (UP),

Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030, Porto, Portugal

Tel +35122 2078940 Fax +351222004427-e-mail: [cristina.couto@iscsn.cespu.pt](mailto:cristina.couto@iscsn.cespu.pt)

**Palavras-chave:** flúor, chás, ice teas

## Resumo:

O consumo diário de flúor resulta de um grande número de fontes, quer dietéticas quer ambientais, e como tal a OMS recomenda que seja efectuada uma verificação da exposição a níveis adequados deste elemento no ar e na alimentação. A dose diária de referência para via oral estabelecida pela US EPA é definida como 0,06 mg/Kg/dia [1].

Uma potencial fonte de flúor é a planta do chá (*Camellia sinensis*). Esta acumula flúor, absorvendo-o selectivamente a partir do solo e do ar [2,3]. Desta forma, o consumo elevado e crescente de chás, de forma directa ou sob a forma de refrigerantes - designados genericamente de “Ice Teas”- poderá constituir uma fonte sistémica efectiva de flúor para o organismo, com potencial carácter cariogénico.

O objectivo deste trabalho consistiu na determinação do teor de fluoreto em 10 amostras de chás, bem como a cedência de flúor com diferentes tempos de infusão. Adicionalmente estudaram-se ainda 9 bebidas refrigerantes, contendo chá na sua composição.

As determinações foram efectuadas por potenciometria directa recorrendo a um eléctrodo selectivo de fluoreto. Foram encontrados valores significativos de fluoreto nas amostras analisadas, que devem ser tidos em conta na ingestão diária recomendada de flúor.

## 1. INTRODUÇÃO

A fluorose é uma preocupação actual nos países industrializados nos quais já se alcançou uma redução significativa da cárie dentária. A exposição a níveis elevados de flúor pode causar sinais desde manchas e pequenas depressões nos dentes, permanentes nas crianças, a excrescências ósseas na coluna vertebral e osteoartrite nos adultos.

O consumo de flúor é variável e resulta de um grande número de fontes, quer dietéticas quer ambientais, e por isso, a OMS recomenda uma pesquisa das fontes de flúor extra-água, para verificar a exposição a níveis adequados deste elemento no ar e alimentação.

Uma das potenciais fontes de fluoreto resulta do consumo de chás. As plantas do chá (*Camellia sinensis*) acumulam flúor, absorvendo-o selectivamente a partir do solo e do ar, sendo 98% dele armazenado nas folhas [2,3]. Desta forma, o consumo elevado e crescente de chás pode ser um veículo efectivo de flúor no nosso organismo.

A crescente ingestão de refrigerantes, nomeadamente bebidas contendo na sua composição chá ou infusões, é igualmente importante na quantificação da dose diária de flúor consumido através da alimentação.

## 2. Materiais e métodos

Foram seleccionadas 10 marcas de chá comercializadas em Portugal, das quais algumas plantadas em Portugal (Açores).

Foram pesadas tomas correspondentes a cerca de 10 g de chá, adicionadas a cerca de 200 mL de água à ebulição. De forma a avaliar a variação da cedência do flúor com o tempo de infusão foram sendo retiradas alíquotas e fizeram-se determinações ao fim de 5, 10, 20, 30 e 40 minutos. Foram também comparadas as mesmas marcas sob apresentações diferentes (folha e saqueta).

Foram igualmente seleccionados 9 refrigerantes contendo chá, comercializados em Portugal. As análises de fluoreto nas bebidas foram efectuadas de forma directa após ajuste de força iónica.

As determinações foram efectuadas por potenciometria recorrendo a um eléctrodo selectivo para o anião fluoreto (Mettler Toledo 96-55) e eléctrodo de referência (Mettler Toledo 52-41) em dois potenciómetros (CRISON GLP22 e CRISON Micro pH 2002). As determinações foram efectuadas com adição de TISAB como ajustador de força iónica.

## 3. Resultados e Discussão

A dose diária de referência para via oral estabelecida pela US EPA é definida como 0,06 mg/Kg/dia [1]. Os teores de fluoreto encontrados nas amostras testadas são, nalguns casos significativos, e como tal, devem ser tidos em conta na dose diária consumida (Tabelas 1 e 2). O tempo de infusão do chá influencia significativamente o teor de fluoreto cedido.

Em casos de consumo moderado esta contribuição é importante mas não é quantitativamente significativa. Nas situações de consumo diário de chás em doses elevadas tem que se avaliar outras possíveis fontes simultâneas de flúor, nomeadamente produtos de higiene oral fluoretados e suplementos de flúor, para que não se exceda a dose diária recomendada.

**Tabela 1. Teor de Fluoreto ( $\text{mg L}^{-1}$ ), em diferentes marcas de chás, submetidas a diferentes tempos de infusão**

|                                    | 5 minutos | 10 minutos | 20 minutos | 30 minutos | 40 minutos |
|------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Porto Formoso Broken Leaf</i>   | 0,139     | 0,228      | 0,279      | 0,272      | 0,297      |
| <i>Porto Formoso Pekoe</i>         | 0,170     | 0,197      | 0,240      | 0,242      | 0,260      |
| <i>Porto Formoso Orange Pekoe</i>  | 0,211     | 0,262      | 0,285      | 0,274      | 0,294      |
| <i>Gorreana Orange Pekoe</i>       | 0,166     | 0,249      | 0,262      | 0,262      | 0,273      |
| <i>Gorreana Moinha</i>             | 0,257     | 0,305      | 0,333      | 0,358      | 0,369      |
| <i>Gorreana Hysson Chá Verde</i>   | 0,235     | 0,293      | 0,312      | 0,341      | 0,346      |
| <i>Gorreana Pekoe</i>              | 0,157     | 0,206      | 0,233      | 0,249      | 0,261      |
| <i>Gorreana Saquetas Chá Verde</i> | 0,115     | 0,123      | 0,183      | 0,368      | 0,464      |
| <i>Gorreana Broken Leaf</i>        | 0,233     | 0,290      | 0,317      | 0,337      | 0,348      |
| <i>Da Terra Chá Verde</i>          | 0,0929    | 0,0955     | 0,0995     | 0,0978     | 0,0985     |

**Tabela 2. Concentração de fluoreto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de “ice teas”**

| <b>Amostra</b>   | <b>(<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b> |
|--|--|
| <i>Pleno Tisanas Chá Verde e Limão</i>                 | 0,671                                  |
| <i>Pleno Tisanas Cidreira, Tília, Camomila e Limão</i> | 0,432                                  |
| <i>Pleno Tisanas Chá Preto, Ginseng e Limão</i>        | 0,701                                  |
| <i>Lipton Ice Tea Pêssego</i>                          | 0,255                                  |
| <i>Lipton Ice Tea Limão</i>                            | 0,214                                  |
| <i>Lipton Ice Tea Manga</i>                            | 0,132                                  |
| <i>Pingo Doce Ice Tea Pêssego</i>                      | 0,214                                  |
| <i>Pingo Doce Ice Tea Pêssego</i>                      | 0,223                                  |
| <i>Pingo Doce Ice Tea Pêssego</i>                      | 0,223                                  |

#### **4. Conclusões**

Os resultados deste estudo confirmaram que o chá é uma importante fonte de flúor. A concentração de flúor varia não só com o tipo de chá mas também com o tempo de infusão. Nalguns casos, os valores de fluoretos encontrados superaram os valores obtidos nas águas portuguesas de consumo. Assim sendo, a quantidade de flúor ingerido, proveniente de diferentes tipos de alimentos, e através de hábitos de higiene oral, devem ser quantificados de forma a não se ultrapassar a dose diária recomendada, dado que os riscos para a saúde advêm quer de uma toma insuficiente, quer do consumo excessivo.

#### Referências:

- [1] Agence Française de Sécurité des Produits de Santé, Mise au point sur le flúor et la prévention de la carie dentaire, AFSPS, 31 juillet 2002
- [2] J. Cao, Y. Zhao, Y. Li, H.J. Deng, J. Yi, J.W. Liu, Fluoride levels in various black tea commodities: Measurement and safety evaluation, Food and Chemical Toxicology, in press, 2006
- [3] J. Cao, S.F. Luo, J.W. Liu, Y. Li, Safety evaluation on fluoride content in black tea, Food Chemistry, 88 (2004) 233-236

**Agradecimentos: CESPu pelo financiamento do projecto AI/01/2005/CESPu**

## **DETERMINATION OF SODIUM IN BREAD: CONTRIBUTION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY**

*Figueiredo, C.; Santiago, S.; André, C.; Castanheira, I.*

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Lisbon – Portugal

Sodium chloride is the most important salt in human diet. The dietary intake of sodium chloride is closely related to the development of hypertension and other cardiovascular disease. It has also been found that the sodium ion rather than chloride ion is responsible for such adverse effects. Recently sodium intake and bread consumption were considered dietary indicators for health in Europe. Quality of analytical data has longer been regarded to play a key role although few studies have addressed sampling and measurement uncertainty in composition analysis of Portuguese food. The purpose of this work was to study the impact of measurement uncertainty in the determination of assigned value of sodium content in bread.

One hundred samples were analysed. These include white bread, wheat, corn, fortified and hamburger type. The sampling plan was designed according to the national food balance sheet. The sodium contents were quantified by flame photometry and measurement uncertainty was estimated in accordance with Eurachem Citac guide.

The highest sodium value determined was 650 mg/ 100 g. Relative measurement uncertainty reaches in some cases 10%, where the largest contribution comes from sampling. In all types of bread analysed, the sodium values are significantly different between the bakeries under study ( $p < 0.001$ ).

Our study come to conclusion that measurement uncertainty facilitates the sodium content evaluation and makes it easier to compare sodium contents of bread available in different bakeries. The results suggest that the variability in sodium content of bread consumed in Portugal is due to different recipes adopted. The design adopted to estimate measurement uncertainty demonstrate sampling plan as a key criteria for extrapolate analytical into intake values of sodium. The quality framework adopted to determine sodium allows the comparability of Portuguese bread with other types of bread consumed in different countries.

*This work was completed on behalf of the EuroFIR consortium and funded under the EU 6<sup>th</sup> Framework Food Quality and Safety Programme.*

# DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE GLUTAMATO

Martins, C.<sup>1,2</sup>, Cunha, E.<sup>1</sup>, Sales, M.G.<sup>2</sup>, Oliveira, M.B.P.P.<sup>1\*</sup>, Barroso, M.F.<sup>2</sup> e Delerue-Matos, C.<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto  
R. Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto

<sup>(2)</sup> REQUIMTE, Grupo de Reacção e Análises Químicas, Instituto Superior de Engenharia do Porto  
R. Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto  
Tel +351 228 340 500 Fax +351 228 321 159 e-mail: mgf@isep.ipp.pt

**Palavras-chave:** glutamato, eléctrodo de ouro, voltametria, intensificador de sabor, alimentos

**Resumo:** Neste trabalho estudou-se a redução electroquímica do glutamato (GLT) em eléctrodo de ouro, recorrendo-se a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada. O glutamato origina um único pico de redução, independente do pH, ao potencial de -0,8 V *versus* AgCl/Ag. Usando a voltametria cíclica verificou-se que a redução do GLT é um processo irreversível e controlado por difusão. A voltametria de onda quadrada confirmou a irreversibilidade do processo electroquímico e originou um comportamento linear entre corrente e concentração para o intervalo  $2,5 \times 10^{-4}$  a  $2,7 \times 10^{-3}$  mol/L. O limite de detecção é de  $6,3 \times 10^{-5}$  mol/L. A interferência de algumas espécies químicas, que co-existem com o GLT nos produtos alimentares e são passíveis de redução, foi mínima.

## 1. INTRODUÇÃO

O GLT é um intensificador de sabor utilizado ao longo de várias décadas para melhorar o aroma ou o sabor dos alimentos. Encontra-se em vários produtos alimentares comerciais, como molhos e sopas instantâneas. O controlo dos níveis de GLT em alimentos requer técnicas analíticas sensíveis e selectivas sendo possível encontrar várias metodologias descritas na literatura para este efeito. De uma forma geral, predominam as técnicas separativas, baseadas sobretudo em HPLC, e as ópticas, baseadas em medidas de absorção e de emissão na região UV/Vis do espectro [1-9]. Estas técnicas são habitualmente morosas e complexas, originando muitas vezes efluentes com elevada toxicidade.

Uma metodologia que permitisse uma triagem rápida de GLT nos alimentos assegurando o controlo dos teores deste aditivo de acordo com a legislação, seria vantajosa para a indústria alimentar. O controlo analítico de rotina requerido para garantir as características exigidas ao produto final decorreria, assim, de uma forma rápida e económica. Neste sentido, o presente trabalho propõe a determinação de GLT recorrendo a técnicas voltamétricas em eléctrodo de ouro; a voltametria cíclica é proposta para o estudo do comportamento electroquímico do analito e a de onda quadrada é explorada para fins analíticos.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Equipamento

As medições voltamétricas foram realizadas numa célula 663 VA Metrohm contendo um eléctrodo de trabalho de ouro (5 mm de diâmetro), um eléctrodo auxiliar de carbono vítreo e um eléctrodo de referência de AgCl/Ag (KCl 3,00 M), conectados a um Autolab PSTAT 10 potenciostato/galvanostato (Ecochemie). Os sinais analíticos decorrentes foram monitorizados com o software General-purpose electrochemical system (GPES), EcoChemie.

A superfície do eléctrodo de ouro foi limpa antes de cada varrimento voltamétrico por polimento em alumina ( $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,3  $\mu$ m) seguido de uma lavagem com água.

As medições de pH foram efectuadas com um decimilivoltammeter Crison<sup>®</sup>, pHmeter, GLP 22, e um eléctrodo de vidro combinado CWL/S7. Este eléctrodo foi calibrado com soluções tampão comerciais.

## 2.2. Reagentes e soluções

Os reagentes eram Fluka (GLT de sódio) ou Merck (os restantes), de qualidade p.a. e foram utilizados sem qualquer purificação adicional. A água utilizada na preparação das soluções foi purificada com um sistema Barnstead E-pure 4 (condutividade < 0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

O electrólito de suporte para estudos voltamétricos foi  $\text{KNO}_3$ , incluído em soluções de força iónica de 0,5 mol/L. O ajuste de pH deste electrólito foi efectuado por adição de volumes apropriados de soluções de HCl ou de KOH, fornecendo valores de pH de 2,6 a 11,5. Esses compostos foram seleccionados com o objectivo de evitar a adição de espécies iónicas estranhas ao meio ensaiado.

A solução de trabalho mais concentrada em GLT ( $1,00 \times 10^{-1}$  mol/L) foi preparada por pesagem rigorosa do composto e posterior diluição em água.

## 2.3 Procedimento

Os estudos voltamétricos requeriam 20,0 mL de solução de electrólito na célula electroquímica. Esta solução era previamente desoxigenada por corrente de azoto ao longo de 2 minutos. As diferentes concentrações de GLT ensaiadas foram obtidas por adição de um volume conhecido de solução de trabalho de GLT à célula. A solução resultante era purgada com azoto durante 30 segundos, visando a sua homogeneização e a remoção do oxigénio ainda presente.

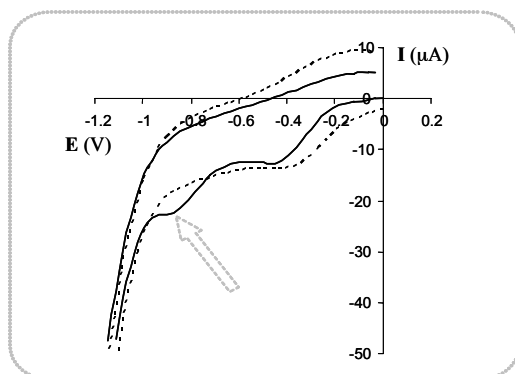
O estudo do comportamento electroquímico do GLT em eléctrodo de trabalho de ouro foi baseado em Voltametria Cíclica (VC) e em Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de iniciar o estudo electroquímico propriamente dito, o perfil electroquímico de GLT em eléctrodo de ouro foi registado em vários electrólitos de suporte. Os voltamogramas obtidos com soluções de  $\text{KNO}_3$  apresentaram os picos com melhor forma e amplitude, pelo que este electrólito foi seleccionado para os estudos subsequentes.

### 3.1 Voltametria Cíclica

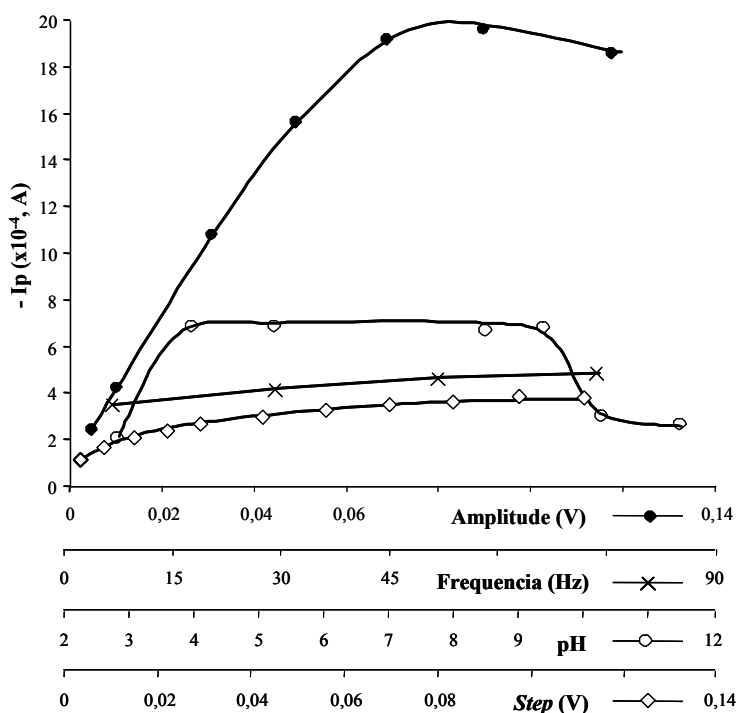
Os varrimentos em VC foram efectuados entre -1,5 V e +1,5 V. Os voltamogramas obtidos mostram um único pico catódico ao potencial de -0.80 V *versus* AgCl/Ag (Figura 1). O potencial do pico encontrado é independente do valor de pH da solução em estudo. A ausência de qualquer pico no varrimento anódico indica que a redução do GLT é uma reacção irreversível. A influência da velocidade de varrimento na intensidade de corrente de pico ( $i_p$ ) foi estudada na gama de 100 a 600 mV/s, verificando-se que existe uma relação linear entre a  $i_p$  e a raiz quadrada da velocidade de varrimento. Esta tendência linear indica que o processo à superfície do eléctrodo é principalmente controlado por difusão.



**Figura 1** – Voltamograma cíclico do electrólito de suporte  $\text{KNO}_3$  (---) e do mesmo electrólito com  $6,0 \times 10^{-4}$  mol/L em GLT (—), usando o eléctrodo de trabalho de ouro.

### 3.2 Voltametria de Onda Quadrada

Os voltamogramas obtidos confirmaram a natureza irreversível da reacção electroquímica. A maior intensidade de corrente produzida foi obtida para valores de pH entre 4 e 9 (Figura 2). Os estudos subsequentes foram, por isso, realizados a pH 7,6. Considerando que a resposta por VOQ depende grandemente das condições instrumentais, foram otimizados vários parâmetros. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 2. Combinando a maior intensidade de corrente de redução com o melhor formato do pico registado, escolheram-se uma frequência de 70 Hz, uma amplitude de pulso 70 mV e um potencial de *step* de 30 mV.



**Figura 2** - Influência do pH, do potencial de *step*, da amplitude e da frequência na corrente do pico para soluções de GLT ( $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L) usando a técnica de VOQ.

Os parâmetros analíticos das curvas de calibração realizadas nas condições experimentais seleccionadas encontram-se resumidos na tabela 1. A resposta obtida através da técnica de VOQ mostrou um comportamento linear entre  $2,5 \times 10^{-4}$  e  $2,7 \times 10^{-3}$  mol/L de GLT. A precisão foi aferida através de várias medidas repetidas de soluções de GLT  $4,0 \times 10^{-4}$  mol/L, obtendo-se um desvio padrão de 3,2 %.

**Tabela 1** – Parâmetros analíticos para a Voltametria de Onda Quadrada

| <i>Parâmetros analíticos</i>                      | <i>Eléctrodo de ouro</i> |
|---|--------------------------|
| pH  | 7,6                      |
| $E_p$ (V)   | -0,80                    |
| Intervalo linear ( $\times 10^{-4}$ mol/L)        | 2,5 – 27                 |
| Declive ( $\times 10^{-4}$ A/mmol/L)              | $0,34 \pm 0,01$          |
| Ordenada na origem ( $\times 10^{-5}$ A)          | $4,01 \pm 0,1$           |
| Coefficiente de correlação                        | 0,9965                   |
| Limite de Detecção ( $\times 10^{-4}$ mol/L)      | 0,63                     |
| Limite de Quantificação ( $\times 10^{-4}$ mol/L) | 1,9                      |

### 3.4 Efeitos das espécies coexistentes

Para possíveis interferentes na determinação de GLT em alimentos escolheram-se algumas espécies susceptíveis de redução electroquímica ou de interacção com o analito. Por entre as espécies ensaiadas apenas níquel, ferro e chumbo interferiram, por acção química e/ou electroquímica, quando adicionados em quantidades iguais ou superiores às de GLT. Considerando que o efeito observado nesta situação induz sempre um aumento fictício da quantidade de GLT determinada, a interferência destes compostos não é crítica aquando de ensaios de triagem, i.e., está garantido o pressuposto de que nenhuma amostra com excesso de GLT seria lançada no mercado.

## 4. CONCLUSÕES

A redução electroquímica do GLT na superfície do eléctrodo de ouro é um processo irreversível e controlado por difusão. O potencial de pico é independente do pH, obtendo-se sinal electroanalítico em toda a gama de pH estudada.

O procedimento analítico em VOQ é rápido, simples, de baixo custo e de impacto ambiental reduzido. O método apresenta características de linearidade numa zona de concentração adequada para a análise das amostras e é económico relativamente ao consumo de reagentes e ao equipamento envolvido. São necessários, porém, estudos adicionais no sentido de confirmar a viabilidade de aplicação do método proposto em situações práticas.

### Referências

- [1] – D. W. Aswad – Anal. Biochem. **137** (1984) 405
- [2] – G. Fortier, D. Tenaschuk, S. L. MacKenzie – Chromatogr. **361** (1986) 253
- [3] – L. W. Anderson, D. W. Zaharevitz, J. M. Strong – Anal. Biochem. **163** (1987) 358
- [4] – R. Mora, K. D. Berndt, H. Tsai, S. C. Meudith – Anal. Biochem. **172** (1988) 368
- [5] – R. Puchades, L. Lemieux, R.E. Simard – J. Food Sci. **54** (1989) 423
- [6] – E. Swanepoel, M.M. de Villiers, J.L. du Preez – J. Chromatogr. A **729** (1996) 287
- [7] – E. Valero, F. Garcia-Carmona – Anal. Biochem. **259** (1998) 265
- [8] – J. Chapman, M. Zhou – Anal. Chim. Acta **402** (1999) 47
- [9] – A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, L. Gorton – Anal. Chem. **72** (2000) 1720



# EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA EM MELÃO FRESCO MINIMAMENTE PROCESSADO

Trigo, M.J.\*; Sousa, M.B.<sup>1</sup>; Sapata, M.<sup>1</sup>; Ferreira, A.<sup>1</sup>; Curado, T.<sup>1</sup>; Andrada, L.<sup>1</sup>; Ferreira, E.<sup>1</sup>;  
Horta, M.P.<sup>1</sup>; Botelho, M.L.<sup>2</sup>; Veloso, M.G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>DTPA, Estação Agronómica Nacional - INIAP, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico e Nuclear, E.N. 10, 2696 Sacavém, Portugal

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, UTL, Lisboa, Portugal

\*Tef.: +351 214403640; Fax: +351214413208; E-mail: [mjptrigo@gmail.com](mailto:mjptrigo@gmail.com)

## Resumo

Os produtos hortofrutícolas estão frequentemente em contacto com o solo, insectos, animais e seres humanos não só durante o desenvolvimento e colheita como por vezes na indústria de processamento. Por essas razões as camadas superficiais dos produtos podem estar expostas a contaminantes naturais, chegando a atingir  $10^4$  a  $10^6$  microrganismos por grama. Embora as bactérias saprófitas, os bolores e as leveduras sejam a flora dominante, os microrganismos patogénicos também podem estar presentes.

Nos últimos anos tem havido um aumento de surtos de toxi-infecções associados ao consumo de frutos e vegetais crus. Surtos de toxi-infecções provocados por *Salmonella* (Chester, Poona e Enteritidis), *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Campylobacter* spp. e vírus Norwalk têm sido associados ao consumo de melão.

Os frutos submetidos ao processamento mínimo são mais percíveis do que os produtos intactos donde provêm, pois o corte aumenta a deterioração microbiana, pela transferência de microrganismos do exterior para o interior, sendo a lavagem dos frutos inteiros com água clorada aplicada para reduzir a contaminação, contudo esta redução pode não ser suficiente. Assim, a irradiação é um processo alternativo, que pode ser aplicado, após a embalagem final do produto, evitando recontaminações.

O objectivo deste trabalho foi a avaliação do efeito da irradiação gama na descontaminação do melão (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) minimamente processado, para aumentar o tempo de vida útil.

O melão inteiro foi lavado com água clorada a 125 ppm, descascado, cortado em cubos, colocado em caixas de Nutrip-PS (polistireno) e seguidamente embalado em filme polimérico (PE) com aplicação de atmosfera modificada passiva. As amostras foram submetidas a radiação gama, com doses de 0,5 e 1 kGy. Foram avaliados parâmetros microbiológicos, fisico-químicos e sensoriais ao longo do período de conservação (11 dias).

Os resultados evidenciam que a irradiação provocou uma redução de 1,5 log na carga microbiana, sem alteração da qualidade organoléptica do produto.

**Palavras chave:** Radiação gama, melão, minimamente processado

## 1. INTRODUÇÃO

A frequência de surtos de toxi-infecções associados ao consumo de frutos frescos tem vindo aumentar nas últimas décadas devido não só às novas práticas e tecnologias utilizadas, mas também às alterações dos hábitos alimentares e à globalização do comércio.

Os frutos e os vegetais podem ser contaminados com microrganismos patogénicos durante o crescimento no campo, colheita, manuseamento pós-colheita e posteriormente durante o processamento e distribuição. Os microrganismos susceptíveis de provocar doenças no homem compreendem bactérias, vírus e parasitas que podem estar presentes na água de rega ou no solo. Por sua vez, é provável a contaminação dos produtos por patogénicos em países onde se utilizam estrumes e efluentes líquidos como fertilizantes. A matéria prima dos alimentos minimamente processados poderá estar contaminada com patogénicos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, oocistos de *Cryptosporidium* e vírus Norwalk. [1, 2, 3]. Nesta conformidade contaminações em melão têm aparecido

associadas a surtos provocados por *Salmonella* spp incluindo Chester, Enteritidis, Oranienburg, Poona e Saphra [4], *Escherichia coli* O157:H7 [5], *Shigella*, *Campylobacter* spp. e vírus Norwalk [6]. A utilização de técnicas para aumentar o tempo de vida útil, como a embalagem em atmosfera modificada, pode permitir que os microrganismos como *Listeria monocytogenes*, que toleram baixas temperaturas, atinjam elevadas concentrações antes do produto apresentar características sensoriais inadequadas [7].

A indústria utiliza geralmente água clorada para controlar o crescimento microbiano, contudo, o hipoclorito tem um baixo poder de inativação para alguns patogénicos como a *L. monocytogenes* conforme foi demonstrado por Zang e Farber [8]. Outra forma de descontaminação destes produtos é a aplicação de radiações ionizantes, que sem causar aquecimento, é um conceito antigo [9] contudo, a sua utilização não está vulgarizada. Trata-se de uma metodologia com perspectivas de aplicação como tecnologia de barreiras altamente promissora. É um tratamento físico em que o alimento é exposto a radiação ionizante com o objectivo de desinfestar e ou descontaminar de modo a aumentar o tempo de vida útil do produto.

O objectivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação no melão minimamente processado para aumentar o tempo de vida útil.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Matéria prima, processamento e conservação**

O melão (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) dquirido no mercado, foi limpo, lavado em água clorada (25ppm NaClO, 3min), descascado, cortado em cubos, embalado em caixas de polistireno (Nutrip-PS) envolvidas em sacos de polietileno (Cryovac-PE65S) e aplicação de atmosfera modificada passiva (20,9% de O<sub>2</sub> e 0,03% de CO<sub>2</sub>).

A irradiação teve lugar na Unidade de Tecnologias de Radiação do Instituto Tecnológico e Nuclear, Sacavém. Foram irradiadas dezoito embalagens por dose (0,5; 1,0 kGy) com uma taxa de dose de 3,7 kGy/h. Em cada ensaio foram colocados três dosímetros Gamachrome YR. A uniformidade de dose foi de 1,1.

As embalagens foram conservadas a 4°C numa câmara frigorífica Zanotti, Vizuite, S, e retiradas para avaliação da qualidade aos 1º, 4º, 7º, 9º e 11º dia.

### **2.2. Parâmetros avaliados**

Os parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais foram avaliados nas amostras irradiadas (0,5; 1,0 kGy) e não irradiadas (0,0 kGy) ao longo da conservação. Foram utilizadas três embalagens em cada dia de amostragem.

Na análise microbiológica foram efectuadas: contagens totais de mesófilos e psicrotróficos aeróbios em Plate Count Agar (Oxoid), a 30°C, 3 dias e a 7°C, 14 dias, respectivamente. As contagens foram expressas em CFU/g (unidades formadoras de colónias/g). As análises foram efectuadas em triplicado.

As análises físico-químicas determinadas foram: textura, expressa em N – texturómetro Stable Microsystems TA-Hdi utilizando um punção de 6 mm de diâmetro, velocidade de 1,5mm.s<sup>-1</sup> e distância de penetração de 10mm; pH – potenciómetro Crison-Micro pH 2002; teor de sólidos solúveis totais (°Brix) – refractómetro ATAGO; exsudato – liquido libertado pelo melão na embalagem, expresso em percentagem; cor superficial – colorímetro de reflectância Minolta Chroma Meter CR 200b, determinados os valores L\*, a\*, b\*, coloração [H\* = arc tang (b\*/a\*)] e saturação [C\* = (a\*<sup>2</sup>+b\*<sup>2</sup>)<sup>1/2</sup>].

A análise sensorial foi realizada por um painel de 8 provadores, tendo-se utilizado uma escala hedónica de 1 a 5. A pontuação 3 foi considerada como limite de comercialização.

Análise estatística: Statistical Analysis System (SAS) software, (SAS, 1999). Foi avaliado o efeito da dose de radiação, tempo de armazenamento, bem como a interacção entre os dois factores recorrendo ao Teste de Duncan para a separação das médias ao nível de  $P \leq 0.05$ .

### 3. Resultados e discussão

Níveis semelhantes de contaminação inicial, em melão, foram observados por Boynton [10] e Okuku e Sapers [11]. Segundo Vadlamudi [12] esta contaminação deve-se à transferência dos microrganismos da casca para o interior durante o corte.

Segundo Fonseca e Rushing [13] a utilização, em melancia, de radiação ultravioleta-C teve um efeito semelhante na redução da flora microbiana, não tendo afectado o exudato, cor e qualidade visual.

A irradiação provocou uma redução de 1,5 logs nas contagens de mesófilos e psicrotróficos totais. Esta redução manteve-se constante durante o período de conservação (Fig. 1).

Reduções idênticas foram obtidas, anteriormente, em melancia [14] e com electrões acelerados em melão [10]. Trigo *et al.* [15, 16, 17] em alface, nabo e salsa observaram reduções superiores (4 logs).

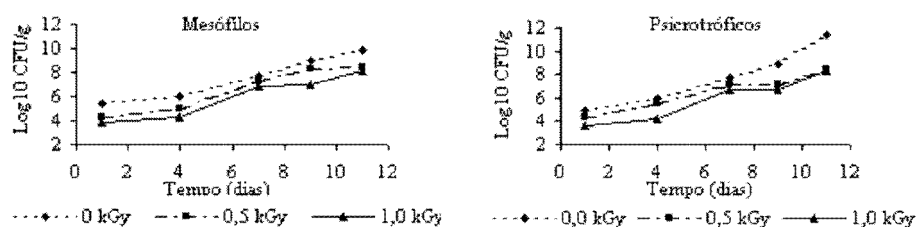


Fig. 1. Contagens de mesófilos e psicrotróficos totais em melão, submetido a várias doses de radiação e ao longo do tempo de armazenamento.

A irradiação e o tempo de conservação não afectaram o pH, °Brix, exsudato e cor superficial do melão (dados não apresentados). Valores semelhantes foram observados em alface, salsa, nabo e melancia [15, 16, 17] com aplicação de electrões acelerados. Boynton [10] também não observou diferenças significativas na cor do melão submetido a várias doses de radiação.

A irradiação pode afectar a firmeza dos produtos através do seu efeito nas membranas e paredes celulares. O amolecimento dos frutos está associado ao aumento da pectina solúvel em água e à diminuição do conteúdo do oxalato de pectina solúvel [18, 19].

Relativamente à textura (Fig. 2), no dia 1, os valores das amostras de melão não irradiado foram significativamente superiores aos das amostras irradiadas, observando-se que a dose de radiação influenciou negativamente a textura. Contudo, esta diferença atenuou-se ao longo do tempo. Resultados semelhantes obteve Boynton [10], em que as amostras do controlo apresentaram valores significativamente superiores em relação às amostras irradiadas. Este autor observou também um decréscimo da textura ao longo do tempo de conservação, o que está de acordo com os resultados por nós observados.

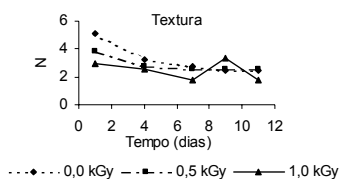


Fig.2. Efeito da irradiação na textura (N) do melão ao longo do tempo de conservação

Do ponto de vista sensorial o melão irradiado a 0,5 e 1,0 kGy apresentou características semelhantes às do melão não irradiado durante todo o tempo do ensaio (11 dias).

O melão irradiado (0,5 e 1,0 kGy) apresentou uma vida útil (9 dias) semelhante à do melão não irradiado, contudo verificou-se uma redução dos níveis microbianos da ordem do 1,5 log o que a nível de segurança alimentar é muito favorável.

## Referências

- [1] D.E. Gombas, Y. Chen, R.S. Clavero, V.N. Scott - Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J. Food Prot. 66 (2003) 559-569.
- [2] P.W. Horby, S.J. O'brien, G.K. Adak, C. Graham, J.I. Hawaker, P. Hunter, C. Lane, A.J. Lawson, R.T. Mitchell, M.H. Reacher, E.J. Threlfall, L.R. Ward - A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. Epidemiology and Infection (2003) 169-178.
- [3] R. Monge, M. Chinchilla - Presence of *Cryptosporium Oocysts* in fresh vegetables. J. Food Prot. 59 (1996) 202-203.
- [4] FDA - Program Information Manual, Retail Food Safety, Produce Safety at Retail: Safe Handling Practices for Melons (2001) [www.cfsan.fda.gov/~ear/retail.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ear/retail.html).
- [5] B.A. Del Rosario, L.R. Beuchat - Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. J Food Prot 58 (1995):105-7.
- [6] L.R. Beuchat - Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Microbes Infect. 4 (2002) 413-423.
- [7] L.R. Beuchat, Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59 (1996) 204-16.
- [8] S. Zhang, J.M. Farber - The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. Food Microbiology 13 (1996) 311-321.
- [9] B. Schwartz - Effect of X-rays on trichinae. *J. Agriculture Research* 20 (1921) 845.
- [10] B.B. Boynton - Determination of the effects of modified atmosphere packaging and irradiation on sensory characteristics, microbiology, texture and color of fresh-cut cantaloupe using modeling for package design. University of Florida (2004) [http://etd.fcla.edu/UF/UFE0008326/boynton\\_b](http://etd.fcla.edu/UF/UFE0008326/boynton_b)
- [11] D.O. Ukudo, G.M. Sapers - Effect of time before storage and storage temperature on survival of *Salmonella* inoculated on fresh-cut melons. Food Microbiol. 24 (2007):288-95
- [12] S. Vadlamudi- Effect of sanitizer treatments on *Salmonella Enterica* serotype Poona on the surface of cantaloupe and cell transfer to the internal tissue during cutting practices. Texas A&M University (2004) <http://handle.tamu.edu/1969.1/1491>
- [13] J.M. Fonseca, J.W. Rushing - Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. Postharvest Biol. Technol. 40 (2006) 256-261.
- [14] M.J. Trigo, M.B. Sousa, M.M. Sapata, A. Ferreira, T. Curado, L. Andrada, E.S. Ferreira, M.L. Botelho, G. Veloso - Effects of low-dose gamma radiation on shelf life of watermelon. Poster 148. Congresso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba Argentina, 15-20 Novembro. Livro de actas p. 195 (2006)
- [15] M.J. Trigo, L. Andrada, T. Curado, A. Ferreira, E.S. Ferreira, M.P. Horta, M.M. Sapata, M.B Sousa, M.L Botelho, G. Veloso - "Effect of  $\gamma$  radiation on minimally processed lettuce". Poster. "Seminário - Qualidade e Segurança Alimentar", Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 20 - 21 de Maio, Livro de Actas, p. 143 (2002)
- [16] M.J. Trigo, M.B. Sousa, M.M. Sapata, A. Ferreira, T. Curado, L. Andrada, E.S. Ferreira, C. Antunes, M.P. Horta, A.R Pereira, M.L Botelho, M.G. Veloso - Efeito da radiação gama em nabo minimamente processado. Proc. "6º Encontro de Química de Alimentos, INIAP-IPIMAR/SPQ, Lisboa, Portugal p: 367-371 (2003)
- [17] M.J. Trigo, M.B. Sousa, M.M. Sapata, A. Ferreira, T. Curado, L. Andrada, E.S; Ferreira, C. Antunes, R. Cordeiro; M.L. Romão, M.P. Horta, M.C. Pegado, M.L. Botelho, G. Veloso,- "Qualidade de Salsa Minimamente Processada Submetida a Radiação Ionizante". Actas em CD do 7º Encontro de Química dos Alimentos. Tradição e Inovação, Saúde e Segurança. -ESAV-IPV/SPQ, Viseu, Portugal, P3.10. (2005)

- [18] C. Willmot, M. Marcotte, L. Deschênes. Ionizing radiation for preservation of fruits. *In: L.P Somogyi, H.S. Ramaswamy, Y.H Hui (Ed.), Biology, Principles and Applications*, vol.1, Technomic Publishing Cco., Inc., Lancaster, USA, pp. 221-260 (1996)
- [19] G. Gunes, C.B. Watkins, J.H. Hotchkiss.. Effects of gamma irradiation on the texture of minimally processed apples slices. *J Food Sci* 66 (2001):63-67.

## DIOXIN-LIKE FOOD CONTAMINANTS: CAN WE ELMINATE THEM FROM THE HUMAN BODY?

Ferreira, H.E.C.S.<sup>1,2,\*</sup>, Gomes, J.F.P.<sup>2,3</sup>, Bordado, J.C.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1096 Lisboa codex, Portugal.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro, nº1, 1950-062, Lisboa, Portugal.

E-mail: hecsf@ist.utl.pt.

The concept that bile acids (BA) and dioxin-like food contaminants (DLC) can be recirculated in the entero-porto-hepatic circulation (EPHC) will be discussed [1]. EPHC can be a major factor in the increased half-life of DLC and their impact on certain (silent) liver pathologies (NASH) [4]. DLC attack on hepatocytes [2,3] may cause a major decrease in BA production, that can compromise intestinal absorption [5] of fat and fat-soluble vitamins, and explain the so-called “waste-away syndrome” [6], and many other neurological, immunological, and blood clotting effects[7,8,5]. We shall present some well-known therapeutic agents (BA, activated charcoal, and clenbuterol) that can be used as possible antidotes of DLC, and propose their individual or combined use as a strategy to eliminate DLC from the human body via faeces [6,9] and reduce exposure, thereby reducing the long-term possibility of cellular carcinogenic effects.

### References

1. Brewster DW, Elwell MR, Birnbaum LS. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93(2):231-46.
2. Chen CY, Hamm JT, Hass JR, Albro PW, Birnbaum LS. *Chemosphere* 2002; 46(9-10):1501-4.
3. Couture LA, Elwell MR, Birnbaum LS. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93(1): 31-46.
4. James OFW. Proceedings of the Falk Symposium 121, Edited by Leuschner U, James OFW, and Dancygier H, Kluwer Academic Publishers, BV. The Netherlands 2001.
5. Bouwman CA, Van Dam E, Fase KM, Koppe JG, Seinen W, Thijssen HH, et al *Chemosphere* 1999; 38(3):489-505.
6. Manara L, Coccia P, Croci T. *Food Chem Toxicol* 1984; 22(10): 815-8.
7. Koppe JG, Pluim HJ, Olie K, van Wijnen J. *Sci Total Environ* 1991; 106(1-2):33-41.
8. Viluksela M, Stahl BU, Birnbaum LS, Schramm KW, Kettrup A, Rozman KK. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 151(1):57-69.
9. Shappell NW, Billey LO, Feil VJ. *J Anim Sci* 2002; 80: 2461-2475.

# EVALUATION OF OCHRATOXIN A IN URINE FROM STUDENTS IN COIMBRA, PORTUGAL: 2006

Pereira, I.; Rodrigues, M.; Carvalho, R.; Manique, R.; Lino, C.M.\*; Pena, A.; Silveira, I.

Group of Bromatology, CEF, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal [cmlino@ci.uc.pt](mailto:cmlino@ci.uc.pt)

**Keywords:** ochratoxin A, urine, students, Coimbra

**Abstract:** Urine levels of OTA were evaluated in 30 students of the University of Coimbra. The evaluation was made in the samples of the same individuals, collected before and after the traditional academic party, Queima das Fitas. Samples were collected during May 2006.

A sensitive and accurate analytical method for the determination of OTA in human urine was used. Linearity was evaluated in the range of 0.05 ng to 0.5 ng, and the correlation coefficient was 0.9975. The obtained recoveries were higher than 91% for all fortification levels and the precision values were lower than 15.4%. The limit of quantification of the proposed method was 0.005 µg/L.

This study revealed that the frequencies of detection before and after Queima das Fitas were 33.3% and 23.3%, respectively. The overall concentrations before the party ranged from 0.005 to 0.031 µg/L, and in the period after from 0.011 to 0.038 µg/L. The mean concentrations and standard deviation before and after Queima das Fitas were 0.005±0.009 µg/L and 0.005±0.01 µg/L, respectively. No significant differences between the two periods were observed,  $P=0.867$ .

## 1. INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* and other related species [1]. As to food safety, the problem of OTA lies in the fact that its presence in human body is due to the ingestion of small quantities present in several commodities, such as, coffee, cereals, rice, dried fruits, beer, wine and muscle tissue [2,3].

Toxicological profile includes nephrotoxicity, causing both acute and chronic lesions of kidneys and has been suspected to be involved in the aetiology of Balkan endemic nephropathy (BEN), a disease characterized by progressive renal fibrosis in humans mainly occurring in some areas of South-Eastern Europe, and its implication in the urinary tract tumours (UTT) [4,5]. OTA is classified as a possible carcinogen to human (Group 2B) by the International Agency for Research on Cancer [6].

When ingested as a food contaminant, OTA is frequently found in human blood due to the long elimination half-life (about 35 days in serum), as consequence of its binding to plasma proteins, its enterohepatic circulation and its re-absorption from urine [7]. This renders OTA among the most frequent mycotoxin contaminants in human blood in the world.

Human exposure to ochratoxin A has been clearly demonstrated by its detection in human blood, urine and breast milk [8-11]. Elimination in urine has been considered the main route of OTA excretion from the human body [12]. Urinary monitoring is relatively unexplored due to the lower concentrations involved, and it is now more feasible and it has the advantage of being less invasive than blood monitoring. However, data in the frequency and concentration of OTA in human urine are scarce.

The aim of the present study was the evaluation of OTA levels in urine samples from students of the University of Coimbra, collected before and after the traditional academic party, Queima das Fitas, since the highest consumption of alcoholic beverages during the referred party could elevate the OTA levels in the reported population.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Solvents and materials

HPLC grade acetonitrile and methanol were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). Acetic acid, sodium hydrogen carbonate and sodium sulphate anhydrous obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ochratoxin A was purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA).

Standard solution of ochratoxin A was prepared from the ochratoxin A vial. The standard stock solution (250 µg/mL) was made in 4 mL toluene–acetic acid (99:1), and stored at -20 °C. Intermediate standard solution (10 µg/mL) was prepared diluting 1 mL of stock standard solution with 25 mL toluene–acetic acid (99:1).

For fortification assays, standard solution was prepared in toluene:acetic acid (99:1) at 1000 ng/mL. Work solutions were prepared in order to obtain fortification levels at 0.02 ng/mL, 0.05, and 0.1 ng/mL. For calibration curve, the standard solutions were prepared evaporating 100 µL of intermediate standard solution at dryness, and diluting to 10 mL with mobile phase (100 ng/mL). After suitable dilutions in water–methanol–acetic acid (49.5:49.5:1), the working standard solution was used to prepare the external calibration curve (1, 2, 5, 10 ng/mL). Immunoaffinity columns Ochratest™ (Vicam/Watertown, USA). Centrifuge Meditronic S-599 (Selecta, Barcelona, Spain). Vortex mixer Retsh (Haan, Germany). Ultrasonic bath Sonorex RK 100 (Berlin, Germany). Water was purified by distillation and passage through Milli Q system (Millipore, Bedford, MA). All chromatographic solvents and water were filtered through a 0.50 µm filter under vacuum and degassed for 15 min in ultrasonic bath.

### 2.2. HPLC system and chromatographic conditions

The HPLC apparatus consisted of a pump model 307 Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel,

France), an injector Rheodyne model 7125 (Cotati, California, USA), and a Perkin Elmer spectrofluorimeter, model LS45 (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) operated at an excitation wavelength of 333 nm and an emission wavelength of 477 nm. The spectral bandwidth was 10 nm for both excitation and emission. The results were recorded on a 3390A integrator (Hewlett Packard, Philadelphia, USA).

A guard column, C18-5 lm, Nucleosil 120 KS (30 x 4 mm i.d.), and a column C18-5 lm, Nucleosil 100 KS (250 x 4.6 mm i.d.) were used.

The mobile phase (acetonitrile/water/acetic acid 49.5: 49.5:1.0 v/v/v) was maintained at a flow rate of 1 mL/min.

### 2.3. Extraction and clean-up

A sensitive and accurate analytical methodology for the determination of OTA in human urine was used (Pena et al., 2006). Briefly, 10 mL of human urine was diluted with 10 mL of a solution of 5% NaHCO<sub>3</sub> in distilled water, and filtered. The clean-up was performed through the OchraTest™ immunoaffinity columns. The OTA was slowly eluted with 3 mL of methanol HPLC grade. The eluate was evaporated to dryness, the residue dissolved in 120 µL of the mobile phase, and 50 µL were injected onto HPLC column.

### 2.4. Sampling

A total 60 samples of human urine were collected from healthy students of the University of Coimbra in May 2006. The evaluation was made in the samples of 30 individuals, collected



before and after the traditional academic party, Queima das Fitas. All volunteers were asked to complete a rapid questionnaire about sex and age.

From 30 participants involved in this study, aged between 19 and 28 years old ( $22.8 \pm 2.2$ ), 76.7% ( $n = 23$ ) were female and 23% ( $n = 7$ ) male. The women were aged between 19 and 28 years ( $22.8 \pm 2.4$ ) and men were between 22 and 26 old ( $22.7 \pm 1.5$ ). All samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis, in order to prevent the OTA degradation.

### 2.5. Statistical analysis

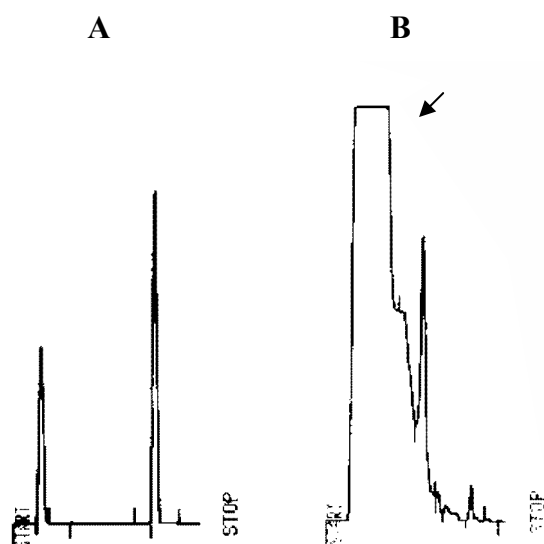
Database management and statistical analysis were performed with the SPSS 10.0 Microsoft version. To test for significant differences between groups, t- test was used.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

For the fluorescence detection a spectrum of OTA standard solution in HPLC mobile phase was obtained in order to optimize detection of OTA. The maximum emission wavelength at an excitation wavelength of 333 nm, was found to be at 477 nm. The isocratic analysis under the conditions described allows the elution of OTA with good resolution. The mean retention time for OTA was 12.16 min. Figure 1 represents chromatograms from OTA standard and one positive sample.

The linearity was evaluated in the range of 0.05 ng to 0.5 ng (1 to 10 ng/mL) with the working standard solutions at three determinations of five concentration levels, and the correlation coefficient ( $r^2$ ) was 0.9975. The obtained recoveries were higher than 91.9% for fortification levels between 0.02 and 0.1 ng/ml and the precision values were lower than 15.4%, demonstrating good method accuracy and precision (Table 1). The limit of quantification of the proposed method determined by the signal-to-noise approach, defined as the level resulting in a signal-to-noise ratio of approximately 10:1, was 0.005  $\mu\text{g/L}$ .

A total of 60 samples of human urine were analyzed under the conditions described and OTA was confirmed in 17 of 60 urine samples (28.3%), at concentrations above the LOQ, ranging between 0.005 and 0.038 ng/mL (Table 2).



**Figure 1.** Chromatograms of (A) OTA standard solution (0.25 ng) (retention time 12.16), and (B) one positive sample containing 0.0064 ng/mL.

**Table 1 - Accuracy and intra-assay validation results**

| Fortification level | Recovery | Repeatability <sup>a</sup> |
|---------------------|----------|----------------------------|
| ng/mL               | %        | SD %                       |
| 0.02                | 91.9     | 15.4                       |
| 0.05                | 91.9     | 12.5                       |
| 0.1                 | 96.7     | 15.2                       |

<sup>a</sup> Repeatability on the basis of three replicates at 0.02, 0.05 and 0.1 ng/mL within the same day.

This study revealed that the frequencies of detection before and after Queima das Fitas were 33.3% and 23.3%, respectively. The overall concentrations, before the party, ranged from 0.005 to 0.031 µg/L, and in the period after from 0.011 to 0.038 ng/mL. The mean concentrations and standard deviation before and after the event were 0.005±0.009 ng/mL and 0.005±0.01 ng/mL, respectively (Table 2). No significant differences between the two periods were observed,  $P=0.867$ .

**Table 2 – Occurrence (%), range and mean concentration (ng/mL) of student samples before and after Queima das Fitas**

|                         | Total samples |               |                 | Feminine gender |              |                 | Masculine gender |              |                 |
|-------------------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|-----------------|
|                         | Occur. %      | Range ng/mL   | Mean conc ng/mL | Occur. %        | Range ng/mL  | Mean conc ng/mL | Occur. %         | Range ng/mL  | Mean conc ng/mL |
| Before Queima das Fitas | 33.3          | 0.005 - 0.031 | 0,005           | 30.4            | 0.005- 0.031 | 0.005           | 42.9             | 0.006- 0.024 | 0.006           |
| After Queima das Fitas  | 23.3          | 0.011 - 0.038 | 0,005           | 17.4            | 0.012- 0.025 | 0.003           | 42.9             | 0.011- 0.038 | 0.0105          |

The differences between genders are also shown in Table 2. OTA was more prevalent in males than in females in both periods, 30.4% vs 42.9% in the first period, and 17.4 vs 42.9%, in the second period. For women, the mean concentration and standard deviation were 0.005 ± 0.009 ng/mL and 0.003 ± 0.007 ng/mL for samples collected in the referred periods, respectively. For men, the mean concentration and standard deviation were 0.006 ± 0.009 ng/mL and 0.011 ± 0.015 ng/mL, before and after Queima das Fitas, respectively. Despite the masculine gender present higher OTA levels than feminine gender in both periods, 0.006 vs 0.005 before and 0.011 vs 0.003 after, significant differences were not found.  $P$  values were 0.895 and 0.247, respectively. For feminine and masculine genders no significant differences were found between and after the traditional academic party.  $P$  values were 0.401 and 0.476 for females and males, respectively.

Comparing these results with other studies from different populations, these results are lower than those found in Coimbra in 2005, 0.027±0.004 ng/mL [13], and in 2006, 0.008±0.012 ng/mL [14], and in the Valencian population in 2006, 0.033±0.031 ng/mL [15]. The frequency of detection is also lower than that of Coimbra in 2005, 60% [13], that of 2006, 36% [14], and that of the Valencian population, 81% [15].

## Acknowledgements

We gratefully thank FCT and POCTI/FEDER for financial support of this study.

## References

- [1] - Alvarez L, Gil G, Ezpeleta O, Garcia-Jalon J, de Cerain L (2004). *Food Chem. Toxicol.* 42, 825-834
- [2] - Moreno Guillamont E, Lino CM, Baeta ML, Pena AS, Silveira MIN, Vinuesa JM (2005). *Anal Bioanal Chem* 383, 570-575
- [3] - Pena A, Cerejo F, Lino C, Silveira I (2005). *Anal Bioanal Chem.* 382, 1288-1293
- [4] - Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M (2002). *Food Addit. Contam.* 19, 282–302
- [5] - Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G (2005). *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 118–130.
- [6] - IARC (1993). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Vol 56, International Agency for Research on Cancer, Geneva, pp. 489–521*
- [7] - Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR (2000). *Arch. Toxicol.* 74, 499–510.
- [8] - Zimmerly B, Dick R (1995). *J. Chromatogr B.* 666, 85-99
- [9] - Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K, Olsen M (2001). *Food Chem. Toxicol.* 39, 1145–1151
- [10] - Dinis AM, Lino CM, Baeta ML, Pena A, Silveira MIN (2003a). *Rev. Toxicol.* 20 (2), 119
- [11] - Dinis AM, Lino CM, Baeta ML, Pena A, Silveira MIN (2003b). *Rev. Port. Farm. LII* (1), 187
- [12] - Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG, Crow G (1997). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 82–90
- [13] - Pena A, Seifrtová M, Lino C, Silveira I, Solish P (2006). *Food Chemical Toxicol.* 44, 1449-1454
- [14] - Lino C, Manique R, Pena A., Moltó JC, Mañes J, Silveira I (2006a). VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. p. 281, P120. Vigo, November 8-10, 2006.
- [15] - Lino C, Manique R, Pena A, Moltó JC, Mañes J, Silveira I (2006b). Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia. p. 29. OT19. OF, Sesimbra, 2-3 Junho 2006

# ESTUDOS DE ESTABILIDADE OXIDATIVA DE AZEITES VIRGENS MONO-VARIETAIS DAS CULTIVARES CORDOVIL DE SERPA, GALEGA VULGAR E VERDEAL ALENTEJANA

*Baer<sup>1</sup>, I.; Ferreira-Dias<sup>2</sup>, S.; Gouveia<sup>3</sup>, J.M.*

<sup>1</sup> Escola Superior Agrária de Beja, ADCTA, Rua de Pedro Soares, 7800 Beja

<sup>2</sup> Instituto Superior de Agronomia, DAIAT, Centro de estudos Agro-Alimentares, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

<sup>3</sup> Instituto Superior de Agronomia, LET-DAIAT, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

## RESUMO

A composição final de um azeite virgem é o resultado de um elevado número de factores que evoluem desde a formação do azeite na azeitona até ao momento do consumo. Alguns destes factores têm um efeito importante na concentração de compostos que modificam a sua resistência à oxidação e que variam com a cultivar e estado de maturação dos frutos.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se estudar a degradação oxidativa de azeites virgens monovarietais obtidos a partir de azeitonas das cultivares que constituem a DOP “Azeite de Moura”: cordovil de Serpa, galega vulgar e verdeal alentejana, em dois estados de maturação. Após extracção do azeite, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro escuro à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e realizaram-se análises laboratoriais bimestrais ao longo de 12 meses com o objectivo de correlacionar esta degradação com alguns compostos constituintes dos azeites obtidos, nomeadamente com a composição em ácidos gordos e teor em antioxidantes (polifenóis e tocoferóis). Após análise estatística dos resultados, foi possível separar as amostras por cultivar e estado de maturação da azeitona, concluindo-se que o azeite mais resistente à oxidação foi o extraído de azeitonas da cultivar galega vulgar, nos dois estados de maturação.

**Palavras-chave:** azeite virgem, degradação oxidativa, antioxidantes, maturação da azeitona, ácidos gordos

# EXTRACÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS DA POLPA E DAS CASCAS DA PÊRA ROCHA E DA MAÇÃ ROYAL GALA

*Pinheiro, J.<sup>1</sup>, Alegria, C.<sup>1</sup>, Lopes, C.<sup>2</sup>, Lourenço, J.A.A.<sup>2</sup>, Abreu, M.<sup>1</sup>, Gonçalves, E.M.<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI  
Estrada Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia das Industrias Químicas, INETI  
Estrada Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

Tel +351-21 712 7153 Fax +351-21 712 7116 e-mail: [elsa.goncalves@mail2.ineti.pt](mailto:elsa.goncalves@mail2.ineti.pt)

**Palavras-chave:** pêra Rocha, maçã Royal Gala, extracção, antioxidantes, fenólicos.

**Resumo:** Este trabalho preliminar visou a quantificação das fracções fenólicas totais, determinação das respectivas capacidades antioxidantes e perfis cromatográficos nas polpas dos frutos pêra Rocha e maçã Royal Gala e nos seus respectivos resíduos industriais (cascas e sementes), com o objectivo de avaliar uma possível utilização destes produtos para produção de antioxidantes naturais.

## 1. INTRODUÇÃO

Os frutos constituem uma componente imprescindível na dieta humana, apresentando-se ao consumidor sob diversas formas e com diferentes graus de transformação.

De uma forma geral, os frutos caracterizam-se por apresentarem elevados teores de açúcares, constituindo também uma importante fonte de fibra, vitaminas e compostos fenólicos (CF), atribuindo-se a estes últimos um papel funcional em termos de benefícios para a saúde humana, que deriva essencialmente da sua capacidade antioxidante [1]. Evidências epidemiológicas sugerem que os compostos fenólicos têm um efeito de protecção contra doenças degenerativas [2].

Os compostos fenólicos com actividade antioxidante têm sido identificados em diversos subprodutos agrícolas como as cascas de frutos. A maçã e a pêra são frutos que apresentam elevado conteúdo fenólico nomeadamente ao nível da casca [3]. Ambos são extensivamente produzidos em Portugal, com cotas de produção que ascenderam a  $383 \times 10^3$  t no ano de 2003 [4]. As perdas pós colheita, em parte, com origem em frutos de calibre inadequado (menor) para o mercado em fresco inviabilizam o escoamento de grandes quantidades destes frutos. A viabilidade de extracção e recuperação destes compostos a partir de frutos e/ou respectivos subprodutos, insere-se numa óptica actual de aproveitamento de recursos desperdiçados, com vista à produção de aditivos naturais (alternativos aos aditivos químicos / sintéticos) com aplicação alimentar e farmacêutica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

A pêra *Rocha* e a maçã *Royal Gala* utilizadas neste trabalho foram adquiridas num supermercado da região de Lisboa. Após o descasque (10 kg / espécie), foram constituídos dois tipos de amostras para cada um dos frutos, com as seguintes identificações: amostras\_P (polpa dos frutos) e amostras\_CS (cascas e sementes), sendo posteriormente submetidas ao processo de extracção. Os diferentes extractos obtidos foram analisados quanto ao conteúdo e perfil fenólico, e respectiva actividade antioxidante.

Na optimização do processo de extracção por sistema soxhlet, a partir de uma proporção de mistura inicial (1:12, p:v), foi avaliado o tipo de solvente utilizado na extracção (água

desionizada, etanol e acetato de etilo). Nos dois tipos de amostras (CS e P) constituídas para cada fruto, foram recolhidos extractos, após os ciclos 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 25, e analisados em relação ao teor fenólico total. Nos extractos obtidos segundo condições de extracção optimizadas (tipo de solvente e nº de ciclos que maximizam o conteúdo fenólico), procedeu-se à análise da capacidade antioxidante, conteúdo e perfil fenólico total, dos dois tipos de amostras, para ambos os frutos.

## 2.2 Métodos Analíticos

O teor fenólico total foi determinado segundo o método colorimétrico descrito por [5], sendo os resultados (triplicados) expressos em mg GAE (equivalente a ácido gálico) por 100 g de produto.

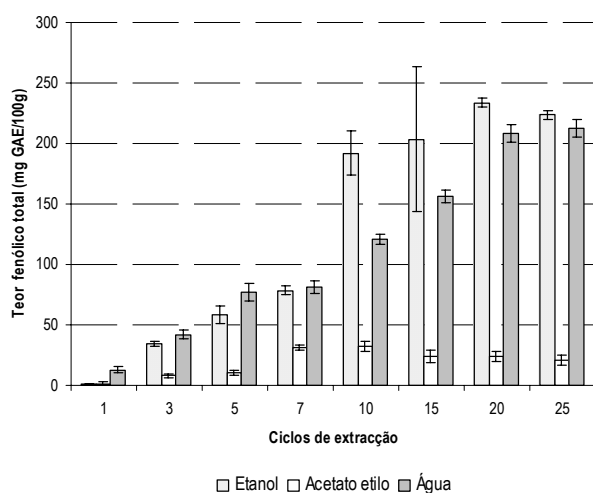
A capacidade antioxidante foi determinada segundo [6], tendo como princípio a reactividade do radical  $ABTS^{\bullet+}$  com o Trolox. Resumidamente, após acerto da absorvância do radical  $ABTS^{\bullet+}$  (7 mM ABTS, 2.45 mM  $K_2S_2O_8$ ) a  $0.70 \pm 0.02$ , a inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$  promovida pelo extracto (1:100, v:v) foi monitorizada (7 min, 30°C) a 734 nm. A calibração foi realizada com padrões de Trolox (0–15  $\mu$ M), exprimindo-se os resultados em  $\mu$ molTEAC/100 g.

O perfil fenólico foi efectuado em sistema HPLC da Waters (In-Line Degasser; 600 HPLC pump; 717 plus Autosampler; Photodiode Array Detector (PDA) 2296), equipado com uma coluna NovaPack C18 (300 mm x 3,9 mm, 4  $\mu$ m) da Waters. Condições de corrida: fluxo: 1 ml.min<sup>-1</sup>; Gradiente: 12% B, 5 min; 15% B, 5 min; 30% B, 25 min; 50% B, 5 min; 50% B, 10 min; 12% B, 10 min. Composição da fase móvel: A - H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,3%); B – CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:20:0,3%); Tempo total de corrida: 80 min; Detecção UV/VIS: 190 – 600 nm; Volume de injeção: 20  $\mu$ l. A recolha e o tratamento de resultados foi efectuada com o auxílio do software Empower Software Build 1154 (2002) da Waters.

A análise ANOVA para comparação de médias (teste de Tukey; p=0.05) efectuou-se com recurso ao Software Statistica<sup>TM</sup> v.6.1 da Stasoft.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1, demonstra que a maximização do conteúdo fenólico nas amostras de pêra *Rocha*

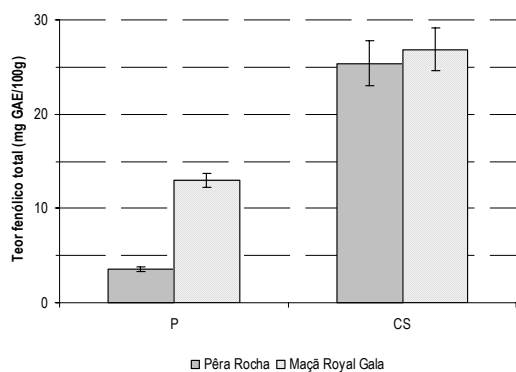


**Fig. 1.** Conteúdo fenólico total (mg GAE/100g) obtido nos extractos dos diferentes ciclos a partir das amostras (CS) de pêra *Rocha*.

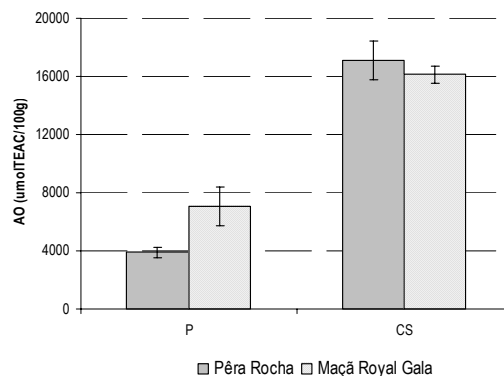
(CS), foi alcançada a partir do vigésimo ciclo de extracção, mediante a utilização de água e etanol, como solventes ( $p > 0.05$ ). Para o solvente acetato de etilo, a mesma situação verificou-se após o 7º ciclo, no entanto, com quantitativos fenólicos significativamente ( $p < 0.05$ ) inferiores (em 6 e 4 vezes relativamente ao etanol e água, respectivamente).

Resultados semelhantes (dados não apresentados) foram obtidos com os restantes tipos de amostras para os dois frutos, estabelecendo-se as condições posteriores de extracção, em água, com recolha dos extractos para análise ao fim do 20º ciclo.

Através da fig. 2 é possível constatar diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre o conteúdo fenólico total, analisado a partir dos extractos de polpa (amostras\_P) dos dois frutos, sendo obtidos para a maçã valores de 13.0 mg GAE/100g, correspondente ao triplo do registo obtido na pêra. No entanto, não se registaram variações significativas ( $p > 0.05$ ), nos extractos obtidos a partir das cascas e sementes de ambos os frutos ( $25.4 \pm 2.4$  mg GAE/100g e  $26.8 \pm 2.2$  mg GAE/100g, pêra e maçã, respectivamente).



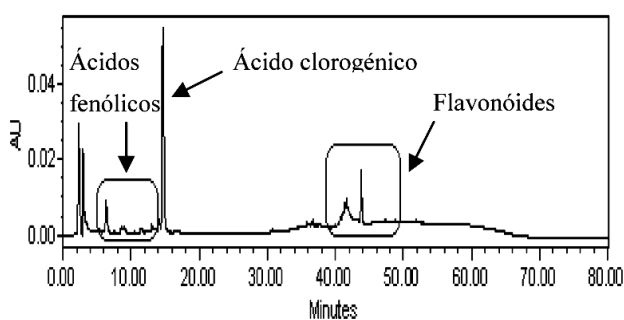
**Fig. 2.** Conteúdo fenólico total (mg GAE/100g) analisado nos extractos obtidos a partir das amostras (P e CS) de pêra *Rocha* e maçã *Royal Gala*.



**Fig. 3.** Actividade antioxidante (µmol TEAC/100g) analisado nos extractos obtidos a partir das amostras (P e CS) de pêra *Rocha* e maçã *Royal Gala*.

Na fig. 3, apresentam-se os resultados da actividade antioxidante para ambos os frutos e tipos de amostras (CS e P). Os mesmos, reflectem um comportamento semelhante ao anterior, traduzido por actividades antioxidantes análogas ( $p > 0.05$ ) nos dois frutos (de *ca* 16500 µmolTEAC/100g) ao nível da casca e sementes (amostras\_CS) e, significativamente superiores aos registos obtidos nas polpas, verificando-se igualmente nesta zona um valor superior na maçã ( $70498 \pm 1332$  µmolTEAC/100g) com significado estatístico ( $p < 0.05$ ).

Na fig. 4, apresenta-se um dos cromatogramas obtidos a partir de extractos de polpa da pêra *Rocha*. Deste cromatograma é possível identificar (98% de certeza) o ácido clorogénico, como o composto fenólico mais representativo presente no extracto de polpa de pêra *Rocha*,



**Fig. 4.** Perfil fenólico analisado (280nm) no extracto obtido na amostra\_P, de pêra *Rocha*.

correspondente a 85.5% da área total dos picos detectados. O elevado quantitativo deste composto em outras variedades de pêra, é igualmente referido em [7], funcionando o mesmo como indicador de autenticidade da presença deste fruto em produtos alimentares [8]. Outros compostos representativos no perfil, pertencem possivelmente à classe dos flavonóides de acordo com os tempos de retenção observados (a variar de 30 a 50 min), no entanto, não foram inequivocamente identificados.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados quantitativos e qualitativos obtidos no âmbito deste estudo preliminar confirmam o elevado potencial de recuperação de compostos fenólicos com actividade anti-oxidante, extraídos a partir das cascas e sementes de pêra *Rocha* e maçã *Royal Gala*.

#### Referências

- [1] – C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga – *Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids* - Free Radical Biology & Medicine, **20** (1996), 933.
- [2] – M.G.L. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, M. Pekkarinen, B.S. Simic, H. Toshima, E.J.M Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan M. B. – *Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study* – Archives of Internal Medicine, **155** (1995) 381.
- [3] – A. Schieber, P. Keller, R. Carle – *Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high performance liquid chromatography* – Journal of Chromatography A, **910** (2001), 265.
- [4] – Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar – *Anuário Vegetal 2004*, (Ed.) Castel – Publicações e Edições, SA., Porto (2004).
- [5] – V.L. Singleton, J.A. Rossi – *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents* – American Journal of Enology and Viticulture 16(3) (1965), 144.
- [6] – R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans – *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay* – Free Radical Biology & Medicine **26**(9) (1999), 1231.
- [7] – W. Oleszek, M.J. Amiot, S.Y. Aubert - *Identification of some phenolics in pear fruit* – Journal of Agriculture and Food Chemistry, **42**(6) (1994), 1261.
- [8] - B.M. Silva, P.B. Andrade, G.C. Mendes, P. Valentão, R.M. Seabra, M.A. Ferreira - *Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity* – Journal of Agriculture and Food Chemistry **48** (2000), 2853.



# FATTY ACID COMPOSITION AND RELATED NUTRITIONAL VALUE IN PORTUGUESE YOGURTS

*Martins, S.I.V.<sup>1</sup>; Lopes, P.A.<sup>1</sup>; Alfaia, C.M.M.<sup>1</sup>; Alves, S.P.A.<sup>2</sup>; Bessa, R.J.B.<sup>2</sup>; Castro, M.L.F.<sup>3</sup> and Prates, J.A.M.<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - CIISA, Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup> Estação Zootécnica Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia - Centro de Estudos Farmacêuticos, Av. Professor Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal.

\* tel. 213652890, fax. 213652895, japrates@fmv.utl.pt.

**Key-words:** yogurt, fatty acids, nutritional indexes, commercial yogurt brands.

**ABSTRACT:** Natural whole milk yogurt has a similar nutritional value to whole boiled milk, being rich in fat, protein and minerals. In Portugal, yogurt contributes up to 25% of dairy product sales, being for this reason important from a nutritional point of view. In this study, we intended to characterize the lipid composition (lipid and fatty acids contents) and further, to compare the nutritional value of the three most brand sold yogurts – Mimosa, Danone and Nestle, using the related health ratios (n-6/n-3, PUFA/SFA and hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic indexes). The analyses were performed by GC/FID in natural yogurts, as the basis for all the other variants production. In what concerns the results, values for SFA, PUFA/SFA and hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratios were similar for all the three yogurts. In general, the PUFA/SFA index was found to be lower than the recommended value for human health diet, higher than 0.45, which comprises a complete diet. Mimosa presented higher values of MUFA but lower levels of TFA in comparison with Danone and Nestle yogurts. On the other hand, the highest value of PUFA was found in Danone samples (3.92, 3.76, 3.48, for Danone, Nestle, Mimosa, respectively). Moreover, the n-6/n-3 index was 5.35 for Nestle and 8.63 for Danone, which were greatly lower than the one observed for Mimosa (11.34). In addition, the Mimosa yogurt presented the lesser value of total fat (9.5 g/100 g yogurt) compared to Danone (10.5 g/100 g yogurt) and Nestle (15.1 g/100 g yogurt). In summary, we presented in detail an approach to the fat profile of Portuguese yogurts. The main difference among yogurts was found for n-6/n-3 ratio, lower, and so more favourable, in Nestle, intermediate in Danone and higher in Mimosa.

## 1. INTRODUCTION

In today's World, fat content and fatty acid composition of diet products have been extensively studied, although this research field has recently regained noticeable attention due to its implications for human health [1]. Health institutions have recommended reductions in total fat intake (15-30% of calories), particularly for saturated fatty acids (SFA; < 10% of caloric intake), due to its association with increased risk of obesity, hypercholesterolemia and some cancers [2]. In addition, low ratios of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids (PUFA/SFA) in Western diets have been considered as major risk factors for cardiovascular diseases, which are among the most important causes of human mortality in developed countries [3,4], including Portugal. Moreover, typical Western diets display a very high n-6/n-3 ratio (15-17/1), which favours the development of cancer and cardiovascular, inflammatory

and autoimmune diseases [5]. It is well known that the lower PUFA/SFA and higher n-6/n-3 ratios of some products contribute for the imbalance in the fatty acid intake of today's consumers [1].

Dairy products, including yogurt constitute beneficial and attractive food for consumers. Yogurt is a milk curd produced all over the world, obtained by a lactic fermentation of a milk based enriched with milk proteins, minerals and fat, and sometimes sugars and thickeners [6]. Being one of the many derivatives from milk fat, yogurt contains some fatty acids shown to have biological properties to human health [7]. In the Portuguese diet, yogurt contributes up to 25% of dairy product sales [8], which certainly justifies its importance from a nutritional point of view.

As being so, it becomes imperative to characterize the health value of fat in Portuguese yogurts by determining its lipid content (lipid and fatty acids composition). In addition, we aimed to compare the nutritional value of the three most important brand yogurts – Mimosa, Danone and Nestle by using the related health indexes (n-6/n-3, PUFA/SFA and hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratios).

## 2. MATERIALS AND METHODS

Forty five samples of the three most important commercial Portuguese brands [8] of yogurt – Mimosa, Danone and Nestle were obtained in a regular supermarket. Yogurt samples were lyophilised (-60 °C and 2.0 hPa) to constant weight using a lyophilisator Edwards Modulyo, maintained exsiccated at room temperature and analysed within two weeks.

Lipid extraction from lyophilised yogurt samples was performed using the procedures described by Fritsche et al. [9]. Briefly, fat was extracted three times with methylene chloride/methanol (4:1 v/v) and a fourth time with *n*-hexane [9,10]. Fatty acids were converted to methyl esters by base-catalysed transesterification with sodium methoxide during 2 hours at 30°C, as was previously proposed [11,12]. Total lipids were measured gravimetrically, in duplicate, by weighting the fatty residue obtained after solvent evaporation [13].

Gas chromatography analyses of FAME were performed with an Agilent 6890 Series II gas chromatograph fitted with a flame ionization detector (FID). The FAME were separated on a SP™ - 2560 fused-silica capillary column, coated with cyanopropyl polysiloxane stationary phase, using a split/splitless injection system (split ratio of 1:5) and helium as carrier gas at a flow rate of 1.5 ml/min. The detector and injection temperatures were set at 250 °C. Identification was accomplished by comparing the retention time of peaks from samples with those of FAME standard mixtures and values published in the literature [10,14]. Quantification of FAME was based on the internal standard technique, using nonadecanoic acid (19:0) as internal standard, and on the conversion of relative peak areas into weight percentages, using the corrected response factor of each fatty acid [15].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The lipid composition and nutritional related health ratios found in Mimosa, Danone and Nestle yogurts are summarized in Table 1.

Available information about dairy products, in particular yogurts characteristics in the literature remains scarce. Therefore, the comparison with brands from different countries, and consequently other milk sources is difficult to accomplish. In general, no major differences were found for SFA, PUFA/SFA and hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratios among the studied yogurts (Table 1). Still, relatively to PUFA/SFA index, the values found are lower than the one recommended for a human health diet, that is, higher than 0.45, considering a complete diet [16]. Mimosa yogurt presented lower values of TFA but higher levels of MUFA comparing to its counterparts. On the other hand, the highest value of PUFA was found in Danone samples. Moreover, the n-6/n-3 index for Nestle and Danone were statistically lower than the one observed for Mimosa, being Nestle the brand with the highest n-3 value. Additionally, Mimosa brand had the lesser value of total fat (9.5 g/100 g yogurt) in comparison to Danone (10.5 g/100 g yogurt) and Nestle (15.1 g/100 g yogurt) (Table 1), but altogether these results are clearly higher than the ones found for Canadian and French yogurts [17,18].

#### 4. CONCLUSIONS

Summing up, this study presents a characterization of the three most sold yogurts in Portugal, in terms of fatty acids profile. In addition, it compares their importance from a nutritional point of view. The results indicate that yogurts have differences in the n-6/n-3 ratio but not in PUFA/SFA ratio. The n-6/n-3 ratio was lower, and so more favourable, in Nestle yogurt, intermediate in Danone yogurt and higher in Mimosa yogurt.

#### Acknowledgements

Individual fellowships (SFRH/BD/2005/22566 to Susana Martins and SFRH/BPD/2005/23931 to Paula Lopes) and financial support (POCTI/CVT/2002/44750 and CIISA/2002/52) are acknowledged.

#### References

- [1] - J.D. Wood, R.I. Richardson, G.R. Nute, A.V. Fisher, M.M. Campo, E. Kasapidou, P.R. Sheard, M. Enser - *Meat Sci.* **66** (2004) 21
- [2] - World Health Organization - *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series n° 916, Geneva: World Health Organization (2003)
- [3] - M.B. Katan - *Proc. Nutr. Soc.* **59** (2000) 417
- [4] - S.H. Ganji, A.M. Kamanna, M.L. Kashyap - *J. Nutr. Biochem.* **14** (2003) 298
- [5] - A.P. Simopoulos - *Biomedicine and Pharmacotherapy* **56** (2002) 365
- [6] - I. Sodini, F. Remeuf, S. Haddad, G. Corrieu - *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44** (2004) 113
- [7] - M. Ledoux, J-M. Chardigny, M. Darbois, Y. Soustre, J-L. Sébédio, L. Laloux - *J. Food Comp. Analys.* **18** (2005) 409
- [8] - *Anuário FOOD*, AcNielsen (2003)
- [9] - J. Fritsche, S. Fritsche, M.B. Solomon, M.M. Mossoba, M.P Yurawecz., K. Morehouse, Y. Ku. - *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102** (2000) 667

- [10] - S. Fritsche, T.S. Rumsey, M. Yurawecz, Y. Ku, J. Fritsche - *Eur. Food Res. Technol.* **212** (2001) 621
- [11] - Y. Park, K.J. Albright, Z.Y. Cai, M.W. Pariza - *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 1158
- [12] - J.K. Kramer, C.B. Blackadar, J. Zhou - *Lipids* **37** (2002) 823
- [13] - C.M.M. Alfaia, V.S.S. Ribeiro, M.R.A. Lourenço, M.A.G. Quaresma, S.I.V. Martins, A.P.V. Portugal, C.M.G.A. Fontes, R.J.B. Bessa, M.L.F. Castro, J.A.M. Prates - *Meat Sci.* **72** (2006) 425
- [14] - J.K. Kramer, N. Sehat, M.E. Dugan, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, J.A. Roach, K. Eulitz, J.L. Aalhus, A.L. Schaefer, Y. Ku - *Lipids* **33** (1998) 549
- [15] - ES ISO 5508 - *Animal and vegetable fats and oils – analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. European Standard ISO 5508*, European Committee for Standardization, Brussels (1990)
- [16] - Department of Health - *Nutritional aspects of cardiovascular disease*, Report on Health and Social Subjects N° 46, HMSO, London (1994)
- [17] - D.W.L. Ma, A.A. Wierzbicki, C.J. Field, M.T. Clandinin - *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 1956
- [18] - P. Astorg, N. Arnault, S. Czernichow, N. Noisette, P. Galan, S. Hercberg - *Lipids* **39** (2004) 527

**Table 1** – Fatty acid composition (% of the sum of identified fatty acids) in the most important commercially brands of Portuguese yogurts.

| <b>FAME</b>     | <b>Mimosa (n = 15)</b>     | <b>Danone (n = 15)</b>     | <b>Nestle (n = 15)</b>     |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>SFA</b>      | 65.87 ± 0.785              | 66.17 ± 1.698              | 66.63 ± 0.345              |
| <b>MUFA</b>     | 27.31 ± 0.663 <sup>a</sup> | 26.30 ± 1.399 <sup>b</sup> | 25.76 ± 0.171 <sup>b</sup> |
| <b>TFA</b>      | 2.68 ± 0.031 <sup>a</sup>  | 2.92 ± 0.286 <sup>b</sup>  | 3.04 ± 0.185 <sup>b</sup>  |
| <b>PUFA</b>     | 3.48 ± 0.153 <sup>a</sup>  | 3.92 ± 0.160 <sup>b</sup>  | 3.76 ± 0.065 <sup>c</sup>  |
| <b>n-3</b>      | 0.29 ± 0.029 <sup>a</sup>  | 0.44 ± 0.154 <sup>b</sup>  | 0.60 ± 0.024 <sup>c</sup>  |
| <b>n-6</b>      | 3.23 ± 0.174 <sup>a</sup>  | 3.53 ± 0.303 <sup>b</sup>  | 3.20 ± 0.043 <sup>a</sup>  |
| <b>n-6/n-3</b>  | 11.34 ± 1.737 <sup>a</sup> | 8.63 ± 1.757 <sup>b</sup>  | 5.35 ± 0.152 <sup>c</sup>  |
| <b>h/H</b>      | 0.57 ± 0.043               | 0.55 ± 0.044               | 0.54 ± 0.008               |
| <b>PUFA/SFA</b> | 0.05 ± 0.003               | 0.06 ± 0.002               | 0.07 ± 0.031               |

Values are expressed as mean ± standard deviation.

Rows with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ , by Scheffe's test.

SFA=saturated fatty acids; MUFA=monounsaturated fatty acids; TFA=trans fatty acids; PUFA=polyunsaturated fatty acids; n-6/n-3=n-6/n-3 ratio [(sum of 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6 and 22:4n-6)/(sum of 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3)]; h/H=hypocholesterolaemic/hypercholesterolaemic ratio [(sum of 18:1c9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3)/(sum of 12:0, 14:0 and 16:0)]; PUFA/SFA=polyunsaturated/saturated ratio [(sum of 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3 and 22:6n-3)/(sum of 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0 and 20:0)].

# FITOESTROGÉNIOS NO LEITE DE VACAS COM INGESTÕES EXTREMAS DE LUZERNA

*Martin\**, L.M.; *Castilho\*\**, M.C.; *Abreu\*\*\**, J.M.; *Falcão e Cunha\*\*\**, L. e *Silveira\*\**, M.I.

\*Escola Superior Agrária Coimbra, Bencanta 3040-316 Coimbra, Portugal.

\*\*Faculdade Farmácia Universidade Coimbra, Rua do Norte 3000-295 Coimbra, Portugal.

\*\*\*Instituto Superior Agronomia, Tapada Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal.

## Introdução

A presença de fitoestrogénios no leite tem sido avaliada por alguns cientistas a maior parte trabalhando na área da nutrição humana, muitos destes tentando pesar as consequências da ingestão em crianças. A acção durante a gravidez foi comprovada, sabe-se que pode haver absorção e excreção de fitoestrogénios pelo feto embora não se conheçam as consequências desta exposição (Foster et al 2002). Depois do nascimento, Setchell e colaboradores (1998) obtiveram diferenças significativas para valores de isoflavonas no plasma de crianças alimentados com leite materno ( $4,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou com misturas lácteas à base de leite de vaca ( $9,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou de leite de soja ( $979,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e justificam a elevada concentração de isoflavonas, nos alimentados à base de leite de soja, com a reduzida biotransformação intestinal que também se prova pela escassez de equol no plasma.

A avaliação da presença de fitoestrogénios no leite já foi motivo de estudo embora sejam escassos os resultados publicados, verifica-se serem a enterolactona e o equol os compostos dominantes. King e colaboradores (1998) obtiveram teores extremos de equol ( $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e genisteína ( $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) na Primavera, época do ano em que há abundância de trevos nas pastagens. Concluíram também que a pasteurização não alterava a concentração de fitoestrogénios no leite. Antignac e colaboradores depois de desenvolverem uma metodologia (2003) de quantificação baseada na combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massa, verificaram (2004) que a concentração de fitoestrogénios em leite de agricultura biológica era superior à de leite de agricultura tradicional ( $191,0$  e  $36,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  de equol respectivamente) e não encontraram diferenças significativas para o teor de fitoestrogénios, de leite gordo e magro.

Nos trabalhos referidos não se quantificou a ingestão de fitoestrogénios, apenas a detecção no leite. Um estudo que relacionasse a proporção entre a ingestão e a existência de fitoestrogénios no leite bem como as fases da curva de lactação em que essa presença é mais significativa era oportuno e tem sido esse trabalho que temos desenvolvido com vacas de alta produção ingerindo luzerna. Assim, num ensaio preliminar, verificaram-se diminuições significativas nos fitoestrogénios do leite de vacas sem e com luzerna na dieta. Com a introdução da luzerna o total de fitoestrogénios detectados no leite diminuiu de  $115,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  para  $18,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  predominando entre estes a enterolactona e o equol. Assim, a enterolactona passou de  $74$  para  $11 \mu\text{g.L}^{-1}$  e o equol de  $40,7$  para  $7,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Admitimos que a luzerna poderia causar diminuição significativa de fitoestrogénios no leite, mas ficou por saber a causa desta diminuição. Surge então o ensaio seguinte cujo objectivo foi retirar a soja da dieta e quantificar os fitoestrogénios no leite de vacas ingerindo quantidades muito diferentes de luzerna.

## Desenho experimental

Utilizando um desenho experimental em quadrado latino, foram agrupadas em três blocos de três vacas em fase idêntica de gestação e aleatoriamente atribuídos três tratamentos que consistiam em dietas com 0, 20 ou 40% de luzerna. Onze dias, foi a duração de cada um dos períodos de

alimentação com cada uma das dietas. A ingestão exacta foi contabilizada nos últimos quatro dias de cada tratamento e recolha de amostras nos últimos dois dias do referido período.

### **Recolha de amostras**

Às vacas ordenhadas duas vezes por dia (às 08:00 e 17:00) foi contabilizada a produção individual ao longo de todo o ensaio. Foram recolhidas mostras de leite das duas ordenhas diárias, nos dois últimos dias de cada tratamento e imediatamente congelados (-18°C) até análise de fitoestrogénios. No fim de cada tratamento, foram colhidas amostras representativas, dos alimentos e refugos, acondicionadas em sacos de plástico e congeladas até posterior análise.

### **Reagentes e soluções padrão**

Extracto de *Helix pomatia* da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Padrões fitoestrogénios, fornecidos pela Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha. Daidzeina deuterada da CIL. Soluções padrão foram obtidas através da diluição de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em metanol/DMSO (95:5, v/v) e as soluções de trabalho obtidas por diluições sucessivas entre 100 e  $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , todas mantidas em recipiente opaco a (-18)°C.

### **Extracção, separação e identificação**

A uma amostra de 10mL de leite foi adicionado 50 ng de padrão interno (daidzeina-d<sub>3</sub>), 1mL de tampão acetato (2M, pH 5,2) e 9 mL de acetona. Depois de agitação (vortex, 1 minuto) e centrifugação (10 minutos, 3500 rpm), o sobrenadante foi removido e evaporado sob corrente de azoto a 45°C até metade do volume inicial. Segue-se adição de 300  $\mu\text{L}$  do preparado enzimático (extracto de *Helix pomatia* dissolvido) e manutenção a 50°C durante a noite de forma a permitir a hidrólise dos fitoestrogénios conjugados na forma glucuronida e de sulfatos. Após centrifugação (10 minutos, 3500 rpm), o sobrenadante é aplicado numa coluna de SPE, C18 (1g fase sólida, SDS, Peypin, França) anteriormente activada com 10 mL de metanol e 10 mL de água. Depois duma lavagem com 5 mL de água e 5 mL ciclohexano os analitos são eluídos com 5 + 2 mL de metanol. O extracto é evaporado até à secura sob corrente de azoto a 45°C, dissolvido em 0,2 mL de acetato de etilo e agitado (vortex) até dissolução suficiente. Adição de 1 mL de ciclohexano e nova agitação (vortex, 1 minuto). O extracto é depois aplicado numa coluna de SPE, SiOH (0,5g fase sólida SDS, Peypin, França) anteriormente activada com 20 mL de ciclohexano. Depois duma lavagem com uma solução de 10 mL de ciclohexano/ acetato de etilo (80:20, v/v), os analitos foram eluídos com 10 mL de ciclohexano/acetato de etilo (20:80, v/v). O extracto é evaporado até à secura sob corrente de azoto a 45°C e dissolvido em 50 $\mu\text{L}$  de metanol/ água/ácido acético (30:70:0,5 v/v/v).

Para análise dos alimentos e refugos tomou-se 1g de amostra previamente seca e moída, adiciona-se 50 ng do padrão interno (daidzeina-d<sub>3</sub>) e 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido ascórbico ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Depois, 1 mL de metanol e 9 mL de tampão acetato (2 M pH 5.2) e adição de 300  $\mu\text{L}$  do preparado enzimático (extracto de *Helix pomatia* dissolvido). Após agitação (vortex) a suspensão é mantida a 50°C durante a noite. Segue-se centrifugação (10 min. 3500 rpm) remoção do sobrenadante ao qual se adiciona 10 mL de éter dietílico. Após agitação (vortex, 1 minuto), a fase orgânica é removida e segue-se uma segunda extracção com éter dietílico na porção aquosa. Segue-se adição de 1mL HCl (35%) à fase aquosa (obtida após hidrolise enzimática) e por 90 minutos a 70°C deixa-se decorrer a hidrolise. Depois o pH é corrigido por adição de 1 mL de amónia (32%) e fazem-se duas extracções com éter dietílico (2 x 10 mL) idênticas às referidas anteriormente. Por fim as duas soluções orgânicas são evaporadas até à secura por corrente de azoto a 45 °C e o extracto como para as amostras de leite (colunas SPE C18 e SiOH) sendo o eluato final evaporado até à secura (N<sub>2</sub>, 45°C) e reconstituído com 50  $\mu\text{L}$  de metanol/água/ácido acético (30:70:0,5 v/v/v).

### Separação por HPLC

Foi usado um sistema HPLC com bomba Alliance® 2690 com sistema de gradiente quaternário e injetor automático (Waters, Milford, EUA). A separação em CL foi efectuada numa coluna de modo inverso, com fase estacionária de sílica modificada por octadecano, Nucleosil® C18AB (50x2,1 mm, 5µm + pré coluna 10x2,1 mm) fornecida Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Os solventes de eluição foram o metanol (A) e água com 0,5% (v/v) de ácido acético (B). A composição da fase móvel (A:B, v/v) foi 30:70 a 0 minutos, 100:0 de 13 a 15 minutos e 30:70 de 20 a 30 minutos. O fluxo foi de 0,3 mL.min<sup>-1</sup> e o volume injectado 10µL.

### Identificação por MS/MS.

Os valores de espectrometria de massa foram obtidos através dum QuattroLC® (Waters-Micromass, Manchester, Reino Unido) quadropolo triplo funcionando com modo de ionização em electrospray negativo (ESI) e de detecção com monitorização de reacção múltipla (MRM). O azoto foi usado como gás de nebulização e dissolução, a um fluxo de 90 e 600 L.h<sup>-1</sup> respectivamente. A temperatura inicial e de dissolução foram fixadas a 130 e 400°C respectivamente. O potencial aplicado no capilar (de 2,5 a 4,0 kV) e no cone (de 15 a 30 kV) foram avaliados e otimizados para cada analito. O argon foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 4,0.10<sup>-4</sup> mBar, a energia de colisão variou entre 2 e 30 eV. Foram registados dois diagnósticos de transição MRM para cada analito.

### Discussão dos resultados

Após análise de variância dos dados relativos à produção de leite (tabela 1) verificou-se que não existiam diferenças significativas devido à presença de luzerna na dieta. Para diferentes tempos de gestação verificam-se ingestões de MS, produções de leite e urina significativamente diferentes que traduzem os habituais desempenhos da espécie.

**Tabela 1 – Valores de F para o efeito da alimentação e gestação na produção de leite (L.dia<sup>-1</sup>) no teor de fitoestrogénios (µg.L<sup>-1</sup>) no leite.**

|             | Leite  | CUM   | DAID  | ENTL    | EQO   | FOR   | GEN    |
|-------------|--------|-------|-------|---------|-------|-------|--------|
| Alimentação | 0,095  | 0,459 | 0,420 | 0,140   | 0,473 | 0,365 | 0,338  |
| Gestação    | 4,037* | 0,959 | 1,601 | 6,421** | 2,367 | 2,042 | 5,831* |

\*Significância a 5% de probabilidade \*\*Significância a 1% de probabilidade

Da análise de fitoestrogénios no leite verificou-se não haver diferenças devidas à maior ingestão de luzerna mas há um aumento significativo de enterolactona e genisteína com o aumento do tempo de gestação (tabela 1). Não se provou existir qualquer interacção entre a alimentação e a gestação no teor de fitoestrogénios excretados.

Obteve-se um total de fitoestrogénios por litro de leite, respectivamente de 23, 25 e 21 µg.L<sup>-1</sup> para 0, 20 e 40% de ingestão de luzerna. Valores estes, idênticos ao obtido no ensaio anterior para ingestões de 12% de luzerna (20µg.L<sup>-1</sup>). Estatisticamente não se provam diferenças devidas à ingestão de luzerna mas realçamos a diminuição de 4 µg.L<sup>-1</sup> entre a ingestão de 20 para 40% de luzerna. Confirma-se mais uma vez a preponderância da enterolactona (13,8 µg.L<sup>-1</sup>) e do equol (3,3 µg.L<sup>-1</sup>) nos restantes fitoestrogénios do leite.

Em relação apenas às isoflavonas e seus metabolitos obtivemos valores de 8, 9.5 e 8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para ingestões de 0, 20 e 40% de luzerna o que mantém este leite bastante próximo dos níveis quantificados ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$ ) para o leite materno (Setchell et al 1998).

Verifica-se um acréscimo total de fitoestrogénios no leite de 19, 21 e 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com o aumento do tempo de gestação (1, 3 e +5 meses) e considerando apenas as isoflavomas e seus metabolitos a evolução é de, 8, 7 e 11  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Estes valores revelam um aumento considerável de fitoestrogénios excretados com a evolução da gestação e nestes destacam-se a enterolactona com valores significativamente diferentes, quase duplicam (10 para 18  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) do início para o fim do tempo contemplado.

### **Conclusão**

Para os dois ensaios verificámos uma elevada apetência pela luzerna, a transição para níveis de luzerna mais altos nunca foi problemática para a maioria dos animais, não foram observadas situações de timpanismo nem qualquer outro distúrbio metabólico durante os ensaios. O nível médio de produção de leite não sofreu alteração com diferentes ingestões de luzerna. Com soja e sem luzerna na dieta, a presença de fitoestrogénios no leite é elevada como se verificou no primeiro ensaio ( $120\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Em dietas com luzerna (12, 20 e 40%) verificámos níveis 6 a 5 vezes menores no entanto sem luzerna e sem soja o leite tem teor idêntico ( $23 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Dos fitoestrogénios e seus metabolitos detectados no leite, são a enterolactona e o equol os que aparecem em maior quantidade. Na presença de soja são mais de 92% dos fitoestrogénios no leite e sem soja passam para 78 a 72 e 71% nas dietas com 0, 20 e 40% de luzerna, respectivamente. Esta elevada preponderância torna estes dois metabolitos merecedores de especial atenção na avaliação dos riscos de consumo de leite com fitoestrogénios pelo ser humano.

O método analítico foi muito semelhante para os dois ensaios e no entanto só se detectou sistematicamente cumestrol no leite no ensaio em que a soja não esteve presente na dieta. No entanto, os teores de cumestrol detectados podem ser baixos, respectivamente de 0,56 e 0,54  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para ingestões de luzerna tão elevadas (20 e 40%). Isto leva-nos a ponderar um estudo futuro que avalie mais profundamente as vias de metabolização específicas do cumestrol.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. Antignac J.P., R. Cariou, B. Bizec e F. André ; 2004. *New data regarding phytoestrogens content in bovine milk*. Food Chemistry. **87**: 275-281
2. Antignac J.P., R. Cariou, B. Bizec, J.P. Cravedi e F. André ; 2003. *Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **17**: 1256-1264.
3. Foster, W. F.; S. Chan, L. Platt e C. Highes, 2002. *Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid*. Toxicology Letters. **129**:199-205.
4. King, R. A., M. M. Mano, e R. J. Head; 1998. *Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples*. Journal of Dairy Research. **65**:479-489.
5. Lundh, T.; 1995. *Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals*. P.S.E.B.M. **208**: 33-39.
6. Setchell, K.D.; L. Zimmer-Nechemias, J. Cai e J. E. Heubi; 1998. *Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life*. Am. J. Clinical Nutrition. **68**: 1453S-1461S.



# GESTÃO DE RISCO DE DIOXINAS EM PRODUTOS AVÍCOLAS

*Cardo, M.<sup>1</sup> ; Mariano, G.<sup>1</sup> ; Pinto, M.<sup>1</sup> ; Ferreira, E.<sup>1</sup> ; Martins, A.<sup>2</sup> ; Teixeira, A.<sup>2</sup> ; Almeida, I.<sup>1</sup> ;  
Bernardo, F.<sup>1</sup> ; Pinheiro, C.A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Direcção Geral de Veterinária -Largo da Academia Nacional das Belas Artes, N.º 2, 1249-105 Lisboa  
e-mail: [veterinaria@mail.telepac.pt](mailto:veterinaria@mail.telepac.pt)

<sup>2</sup>Laboratório de Química Orgânica Analítica e de Síntese (LAQAS) – INETI

**Palavras-chave:** Dioxina, Aves, Plano de Contigência, Saúde Pública

**Resumo:** No âmbito do Plano Nacional de Monitorização de Dioxinas foi conhecido em 2005, um resultado laboratorial de dioxinas acima do limite máximo admitido (2 pg PCDD/ F-TEQ-OMS/g de gordura – Regulamento (CE) n.º 2375 de 29 de Novembro), numa amostra de músculo de frango, produzida em Portugal. Na sequência desse facto foi elaborado um Plano de Contigência que teve como objectivos principais: caracterizar os níveis gerais de ocorrência daquelas substâncias contaminantes nas carnes de aves; determinar a fonte de introdução das dioxinas na cadeia alimentar e, sobretudo, estabelecer procedimentos capazes de garantir a não utilização de carnes contaminadas no consumo.

No âmbito do Plano de Contigência foram colhidas amostras de rações e respectivas matérias primas, dos materiais utilizados nas camas das aves e de músculo de frango, peru e pato em diversas explorações avícolas nacionais.

As determinações de dioxinas foram efectuadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRGC-HRMS) no INETI.

Os resultados obtidos nos alimentos compostos não nos permitiu atribuir à dieta a possível origem da contaminação, pelo facto de os valores terem sido todos negativos. Por outro lado as aparas de madeira utilizadas nas respectivas camas revelaram níveis de contaminação superiores a 100 pg TEQ/g, e com perfis de congéneres semelhantes aos detectados na carne das aves. Aponta-se como das hipóteses prováveis para origem destas contaminações a utilização de madeiras obtidas a partir de troncos de árvores ardidas nos fogos florestais usuais no Verão.

No total foram colocadas em vigilância 14 explorações avícolas, tendo sido abatidas e destruídas mais de 80 000 aves.

A adopção de medidas simples, como a troca de camas das aves por materiais garantidamente isentos de dioxinas, permitiu controlar o problema e reduzir os níveis de contaminações para valores conformes às imposições legais.

## 1. INTRODUÇÃO

As dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs) e os dibenzo-furanos policlorados (PCDFs), frequentemente designadas de Dioxinas, são duas classes de compostos aromáticos, tricíclicos, de função éter e estrutura quase planar. Os anéis de benzeno podem encontrar-se ligados a átomos de cloro possibilitando, teoricamente, a formação de combinações diferentes: 75 para as dioxinas e 135 para os furanos. (1)

O cloro aumenta a estabilidade destes compostos, e quando as substituições de cloro são nas posições 2, 3, 7 e 8 tornam-se especialmente importantes devido à sua toxicidade, estabilidade e persistência. (1)

As dioxinas são extremamente resistentes à degradação química, biológica e, por conseguinte, persistem no ambiente e acumulam-se nas cadeias alimentares humana e animal. Estes compostos são eficientemente absorvidos no tracto gastrointestinal e distribuem-se nos tecidos lipídicos. (2)

A maior parte da exposição humana às dioxinas deriva dos géneros alimentícios e, dessa exposição, sendo grande parte proveniente de géneros alimentícios de origem animal, nomeadamente carne, leite, ovos, peixe e seus derivados.

O Plano Nacional de Monitorização das Dioxinas surge na sequência da Recomendação 2004/705/CE de 11 de Outubro de 2004 e consiste na monitorização dos níveis de dioxinas, furanos e PCB sob a forma de dioxinas nos diversos géneros alimentícios. (3)

Durante a execução do Plano Nacional de Monitorização de Dioxinas foi detectado, em 2005, um resultado laboratorial de 4,88 pg PCDD/ F-TEQ-OMS/g de gordura, em músculo de frango oriundo de uma exploração avícola nacional. Considerando que o Regulamento (CE) n.º 2375 do Conselho de 29 de Novembro, alterado em 6 de Fevereiro, pelo Regulamento n.º 199/2006/CE, estabelece um limite máximo de 2 pg PCDD/ F-TEQ-OMS/g de gordura para carne de aves de capoeira, o resultado da amostra colhida encontrava-se acima do permitido e, por isso, não seguro para consumo. As análises subsequentes a músculo de outros animais, pertencentes à mesma exploração, confirmaram a presença deste contaminante. (4), (5)

Atendendo a estas determinações analíticas e à natureza da substância em questão, cujos níveis elevados de contaminação são susceptíveis de causar perigo para a Saúde Pública, determinou-se o abate compulsivo de todas as aves existentes na exploração em causa.

Na sequência deste episódio foi elaborado um Plano de Contigência das Dioxinas com os objectivos de:

- Caracterizar os níveis gerais de ocorrência daquelas substâncias contaminantes nas carnes de aves;
- Averiguar as possíveis fontes de introdução das dioxinas na cadeia alimentar;
- Estabelecer procedimentos capazes de garantir a saúde pública;

## **2. PLANO DE CONTIGÊNCIA DAS DIOXINAS/ MEDIDAS DE GESTÃO DE RISCO**

Atendendo aos resultados obtidos no Plano Nacional de Monitorização de Dioxinas, no estudo efectuado à primeira exploração com resultados não conformes e à Recomendação da Comissão 2002/201/CE de 4 de Março foi elaborado um plano de acção.

O plano seguiu uma abordagem integrada, de forma a reduzir a incidência de dioxinas ao longo da cadeia alimentar humana, com os seguintes componentes:

- Análise das matérias-primas para alimentação animal;
- Análise da água de bebida;
- Análise do músculo de aves;
- Análise de camas dos pavilhões de produção;
- Sensibilização das Associações de produtores e indústria;
- Articulação com outros organismos, nomeadamente s com competência em matérias ambientais;

No Plano de Contigência das Dioxinas, a colheita de amostras é efectuada tendo em conta o Decreto-Lei n.º 195/2003 de 23 de Agosto, que transpõe para ordem jurídica nacional a Directiva 2002/60/CE de 26 de Julho, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial de dioxinas. Desde Janeiro de 2006, e de acordo com a supramencionada recomendação, a Direcção Geral de Veterinária tem nas suas competências essa monitorização estando a execução laboratorial a cargo do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI). As determinações foram efectuadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRGC-HRMS).

Uma componente do plano consiste na colheita aleatória de amostras de músculo de aves e de camas, nas explorações, efectuada pelos técnicos das Direcções Regionais de Agricultura. As explorações que obtiveram determinações superiores ao limite estipulado legalmente foram colocadas sob vigilância e despoletados os procedimentos da retirada do mercado dos produtos que se encontravam no circuito de comercialização e pertenciam ao lote no qual se obteve resultados não conformes (Artigo 19.º do Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro que determina os princípios e normas gerais de legislação alimentar e estabelece os procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios).

O estatuto de exploração sob vigilância implica a comunicação à autoridade competente de todos os movimentos que o operador económico, responsável pela mesma, pretenda efectuar e sua autorização bem como a cooperação na elaboração de inquéritos sobre a exploração (alimentos, camas e sistemas

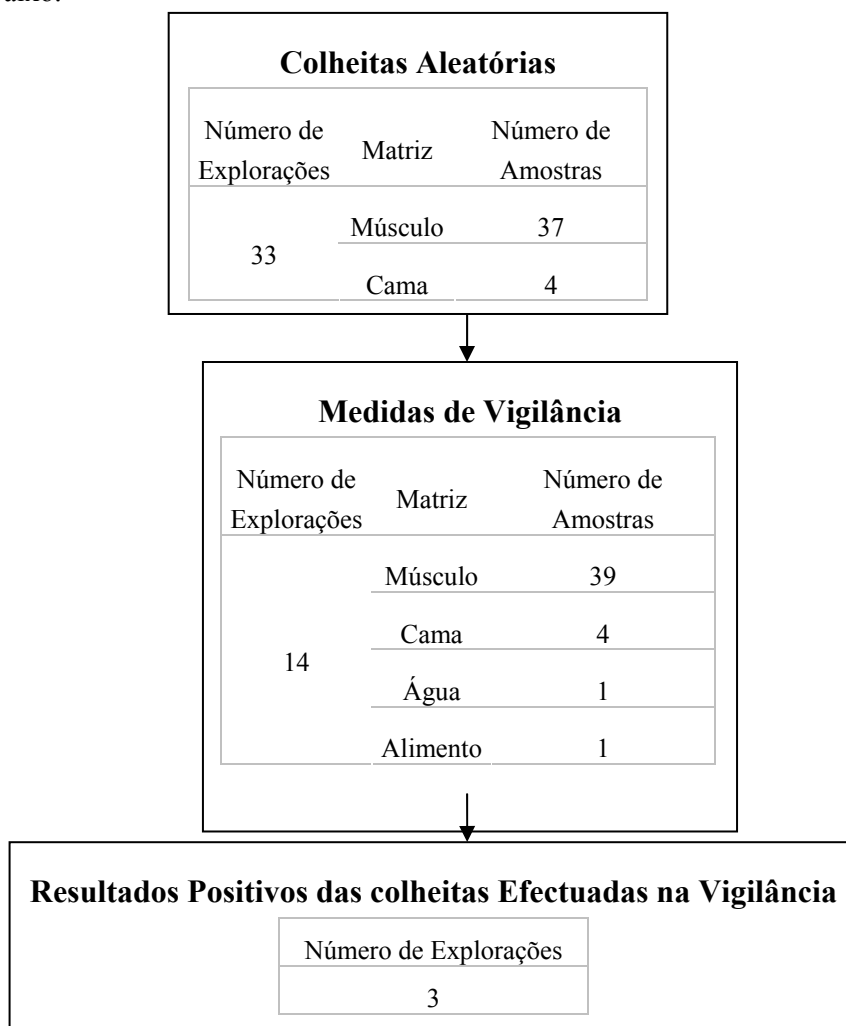
de aquecimento utilizados, entre outros) que permitam averiguar a fonte de contaminação e censo das aves vivas:

- Se os resultados obtidos nas colheitas efectuadas nas explorações sob vigilância forem não conformes é determinado o abate e a destruição das aves.
- O operador económico pode recorrer do resultado, efectuando novas colheitas ou contra-análise.
- Se os resultados obtidos nas colheitas solicitadas pelo operador forem inferiores ao limite estipulado legalmente, é levantada a vigilância e dada livre prática às aves.

Desta forma, as explorações são mantidas sob controlo oficial, nos ciclos produtivos seguintes, até que se obtenham resultados laboratoriais negativos.

### 3. RESULTADOS

Na sequência do Plano de Contingência das Dioxinas foram analisados os músculos de aves de várias explorações, bem como outras matrizes, nomeadamente amostras de cama de aviários, água e alimento. O esquema das colheitas e a fase em que ocorreram, encontram-se representados no diagrama em baixo.



No âmbito do Plano Nacional de Contingência das dioxinas foram amostradas 33 explorações avícolas nacionais, das quais 14 foram colocadas sob vigilância tendo sido abatidas cerca de 80 000 aves na sequência de resultados não conformes obtidos nas amostras colhidas aos animais produzidos nas mesmas.

No quadro seguinte encontram-se os intervalos de valores referentes aos teores de dioxinas quantificados em músculo de aves e em camas usadas na produção avícola:

| <b>Matriz</b> | <b>Intervalo de Valores</b> |
|---------------|-----------------------------|
| Músculo       | 2,4 – 77,93                 |
| Cama          | 2,06 – 367,9                |

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa de dioxinas obtidos no Plano demonstraram que:

- Os teores destes contaminantes no alimento para animais estavam abaixo do estipulado legalmente;
- No músculo a concentração de dioxinas revelou-se não conforme em aves oriundas de 14 explorações;
- O teor de dioxinas na cama utilizada na produção avícola revelou-se, em alguns casos, muito elevado em explorações onde se obtiveram resultados positivos em músculo de aves. Esta determinação permitiu-nos nomear as camas como uma das fontes prováveis de contaminação das carnes, nomeadamente as constituídas por aparas de madeira queimada.

Face a estes resultados foram tomadas algumas medidas pela produção avícola que incluem a mudança da cama das aves para palha traçada e casca de arroz, substituindo as camas de aparas de madeira ou serrim; e a alteração dos sistemas de aquecimento para fora dos pavilhões das aves ou construção de muretes que os separam fisicamente dos animais; foi, no entanto, impossível implementar sistemas de rastreabilidade das camas utilizadas nos diferentes pavilhões, tanto quanto à origem como à sua constituição o que coloca alguns obstáculos no estudo desta via de contaminação.

Foram ainda realizadas acções de inspecção junto das serrações que fornecem as aparas para as explorações avícolas, levadas a cabo pela Inspeção-geral do Ambiente e Ordenamento do Território (IGAOT). Contudo, as informações obtidas não permitem imputar ao processo de tratamento das madeiras a causa de contaminação das camas, uma vez que o tratamento dado às madeiras resume-se à aplicação de antifungos aprovados para o contacto com animais de produção e não outros tipos de tratamento suspeitos. Mostrou-se necessário ainda a intensificação das acções inspectivas com sensibilização deste sector (indústrias madeireiras e serrações) para estas substâncias contaminantes e suas implicações na segurança alimentar.

O Plano de Contigência continua a ser executado bem como as novas abordagens à investigação da presença destes contaminantes ao longo da cadeia alimentar dando continuidade às análises efectuadas acompanhando o ciclo completo de produção, averiguando assim a origem da contaminação (reprodutoras, ovos, camas, sistemas de aquecimento, entre outros) no produto final.

O estudo deste caso pode servir de exemplo relativamente à forma cíclica como as contaminações químicas ambientais são reintroduzidas nas cadeias alimentares. Neste contexto, é necessário que as entidades responsáveis pelo controlo da segurança alimentar mantenham em funcionamento mecanismos de vigilância que mesmo quando não são convencionais, podem-se, no limite, configurar como decisivos para a resolução de problemas sanitários específicos.

Realça-se que, no caso vertente, a eficácia das medidas adoptadas é a resultante de articulação de acções entre as autoridades oficiais e os sectores produtivo e industrial, cuja pronta reacção permitiu fazer face a este problema original de segurança alimentar.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Anon. (2001), Regulamento (CE) n.º 2375, que altera o Regulamento (CE) n.º466/2001 da Comissão que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
- (2) Anon. (2004), Recomendação da Comissão 2004/705/CE relativa à monitorização dos níveis de base das dioxinas e dos PCB sob a forma de dioxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- (3) Anon. (2006), Regulamento (CE) n.º 199/2006/CE, que altera o Regulamento (CE) n.º466/2001 da Comissão que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- (4) João V. A. e Pesquero, C. R. (1999). Dioxinas e Furanos: origens e riscos. *Revista de Saúde Pública*; 33 (5): 523-30.
- (5) Weiss, J. (2006). Human exposure to persistent organic pollutants. Department of Environmental Chemistry, Stockholm University. Sweden

## IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA HACCP NUMA UNIDADE DE FABRICO DE BOMBONS ARTESANAIS

*Marricho, C.; Dias, J. (\*) ; Amaral, A.*

Área Departamental de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Escola Superior Agrária de Beja.  
Rua de Pedro Soares. 7800-459 Beja  
(\*) Email: joao.dias@esab.ipbeja.pt

**Palavras chave:** Qualidade, HACCP, bombons

Para a produção de bombons a empresa Mestre Cacau utiliza chocolate na forma de pepitas. Estas pepitas sofrem um tratamento térmico designado por temperagem. O processo de temperagem envolve três estágios térmicos. Em primeiro lugar as “callets” são aquecidas a uma temperatura de 40°C-45°C. Seguidamente o chocolate fundido sofre um arrefecimento para cerca de 27°C. Numa terceira fase, o chocolate é aquecido novamente até cerca de 32,5°C. Este aumento de temperatura tem dois objectivos: não só diminuir a viscosidade da pasta de chocolate, que aumenta na segunda fase à medida que os cristais se vão formando, mas também assegurar que qualquer forma instável seja derretida. Após a temperagem, a massa de chocolate líquida é colocada em moldes de polycarbonato, a uma temperatura cerca de 30°C – 32°C. Após a colocação de chocolate nos moldes, estes sofrem uma acção de vibração que assegura a distribuição uniforme do chocolate, removendo as bolhas de ar da base, que entretanto ficaram aprisionadas no chocolate. Após alguns minutos é retirado o excesso de chocolate, invertendo os moldes de forma a ficar apenas uma fina camada de chocolate em volta do molde. Depois da moldagem, o chocolate sofre um arrefecimento rápido a 10°C aproximadamente durante 10 minutos. Seguidamente os moldes são cheios com recheio a aproximadamente 29-32°C. Depois de colocado o recheio, os moldes são cobertos com chocolate, para formar a base. A solidificação do chocolate e a sua desmoldagem realiza-se após refrigeração a 10°C. Os bombons solidificados são desmoldados sobre papel vegetal posteriormente embalados e conservados a 15°C-17°C.

Para a implementação do HACCP foram desenvolvidos previamente os códigos de Boas Práticas e o Plano Geral de Higienização, fundamentais para a implementação do sistema HACCP, uma vez que se trata da produção de chocolate artesanal, o que implica um elevado grau de manipulação dos produtos por parte dos operadores. A identificação dos PCC nos vários produtos constitui uma etapa crítica, uma vez que para além dos perigos associados aos operadores e aos perigos associados à higiene dos utensílios, surgiu o problema das matérias-primas para a produção destes produtos serem de tipos muito variados.

# HÁBITOS ALIMENTARES E CONHECIMENTOS SOBRE ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL NUMA POPULAÇÃO ESCOLAR

*Amaral, O.<sup>1</sup>*

Escola Superior Agrária de Beja, Área Departamental de Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Rua Pedro Soares, 7801-908 Beja  
Tel: +351 284 314 300 Fax: +351 284 3888207 e-mail: [olga.amaral@esab.ipbeja.pt](mailto:olga.amaral@esab.ipbeja.pt)

**Palavras chave:** hábitos, alimentação, saudável, população, escolar.

**Resumo:** O presente estudo pretende conhecer os hábitos alimentares de alunos do 3º ciclo de três escolas da cidade de Beja e indagar sobre os seus conhecimentos do que pensam ser uma alimentação saudável. Tem por base um inquérito, constituído por duas partes, que foi elaborado e aplicado a 128 alunos. A análise dos dados da primeira parte, relativa aos hábitos alimentares destes jovens, evidencia vários erros alimentares praticados por uma percentagem importante dos inquiridos: baixa ingestão de sopa, peixe, leguminosas e fruta; substituição do almoço e jantar por sanduíches; excessiva frequência do consumo de batatas fritas, sobremesas doces, refrigerantes com gás, bebidas alcoólicas e guloseimas. Na segunda parte do inquérito, em que se testam os conhecimentos dos jovens sobre o que é uma alimentação saudável, verifica-se que, de uma forma geral, os inquiridos sabem os princípios básicos de uma dieta saudável. Este estudo revela que a alimentação destes jovens apresenta aspectos menos correctos que levam à instalação de hábitos alimentares errados que, provavelmente, se prolongarão pela idade adulta. Estes erros não são o resultado de falta de conhecimentos sobre o que deve fazer parte duma alimentação saudável, mas sim duma escolha menos correcta por parte dos inquiridos sem esquecer o papel fundamental que os pais ainda têm na escolha alimentar destes jovens.

## 1. INTRODUÇÃO

As profundas alterações que os hábitos alimentares, sobretudo das crianças e adolescentes, sofreram nas últimas décadas, estão relacionadas com a nova realidade da abundância de alimentos e com a crescente capacidade económica para os adquirir. O estilo de vida actual origina que muitos jovens tomem a maioria das suas refeições ou fora de casa ou em casa sem a presença dos pais. Muitas vezes são eles próprios que adquirem os alimentos que consomem escolhendo o local de compra e os produtos alimentares.

A par desta realidade a publicidade estimula e induz o consumo de determinados alimentos, a maioria das vezes pouco interessantes do ponto de vista nutritivo mas com propriedades organolépticas (sabor, odor, cor, textura, etc) apelativas, nomeadamente com recurso a oferta de brindes. A mensagem publicitária dirigida aos mais novos conseguiu níveis extraordinariamente eficazes de persuasão. Associada à permissividade, tolerância e ausência de muitos pais, a eficácia desta publicidade é elevada.

---

Agradecimentos: Agradece-se a colaboração dos alunos do 4º ano de Engenharia Alimentar (Ano lectivo 2005/06) Ana Rita Brás, Jorge Serra, Juliana Carvalho, Miguel Teixeira, Paula Almeida, Rita Gonçalves da Silva, Sandra Vital, Sónia Lourenço e Vanda Salvador na elaboração do inquérito e na recolha dos dados.

Simultaneamente, os jovens estão cada vez mais informados sobre as consequências de uma alimentação desequilibrada, quais os alimentos mais saudáveis e os que deverão ser evitados. No entanto, os aspectos organolépticos, a opinião dos colegas e amigos e o efeito da publicidade conseguem “falar mais alto”.

Importa ainda referir a tendência progressiva para estilos de vida inactivos pelo uso massivo das tecnologias da informação e a diminuição acentuada da actividade física espontânea. Todos estes factores vão contribuir para um balanço de energia positivo conduzindo a situações de obesidade.

Hoje em dia vive-se um ambiente alimentar que oferece uma variedade quase ilimitada de produtos, muito atractivos do ponto de vista organoléptico, com uma grande densidade energética, uma baixa qualidade nutricional, em porções cada vez maiores e a um custo muito acessível, disponíveis a cada esquina e a qualquer hora. Este é o ambiente alimentar onde se desenvolve a epidemia do séc. XXI – a obesidade.

## **2. OBJECTIVOS**

Conhecer os hábitos alimentares dos alunos do 3º ciclo de escolas da cidade de Beja e avaliar os seus conhecimentos sobre a prática de uma alimentação saudável.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo foi elaborado um inquérito composto por duas partes. A primeira consiste num conjunto de questões, de resposta fechada, que permite recolher dados sobre os hábitos alimentares dos jovens. Na segunda parte, as questões, também de resposta fechada, avaliam os conhecimentos sobre o que é uma alimentação saudável.

O inquérito foi aplicado a 128 alunos, 70 do sexo feminino e 58 do sexo masculino, entre os 12 e os 18 anos que frequentam os 7º, 8º e 9º anos das escolas Mário Beirão, Santiago Maior e Santa Maria da cidade de Beja. Os dados foram analisados com recurso ao programa SPSS 14.0 for Windows.

## **4. RESULTADOS**

A análise dos dados revelou que 6,3% dos jovens inquiridos não tomam o pequeno-almoço, sobretudo raparigas. Os alimentos mais escolhidos para esta refeição são os cereais, sanduíches/torradas e leite.

O lanche da manhã é efectuado por 75,0% dos alunos o que revela que ¼ dos inquiridos não ingere qualquer alimento num intervalo superior a 5 horas. Este intervalo de tempo é demasiado grande comprometendo o desempenho escolar. Um dos inquiridos que referiu não tomar o pequeno-almoço também não toma o lanche da manhã o que significa que passa toda a manhã sem a ingestão de qualquer alimento. A escolha recai sobre as sanduíches/torradas e



os refrigerantes. O lanche da tarde, realizado por 94,5%, tem como alimentos eleitos as sanduíches/torradas, leite, iogurte, bolachas e bolos.

No que diz respeito às refeições do almoço (A) e do jantar (J), só um inquirido refere não efectuar a refeição do fim do dia. As figuras 1, 2, 3 e 4 representam as frequências (%) de ingestão de alguns alimentos que se salientaram do estudo por serem importantes numa alimentação saudável e a sua frequência ser demasiado baixa e outros por serem alimentos a evitar e terem sido detectados valores excessivamente altos de ingestão frequente.

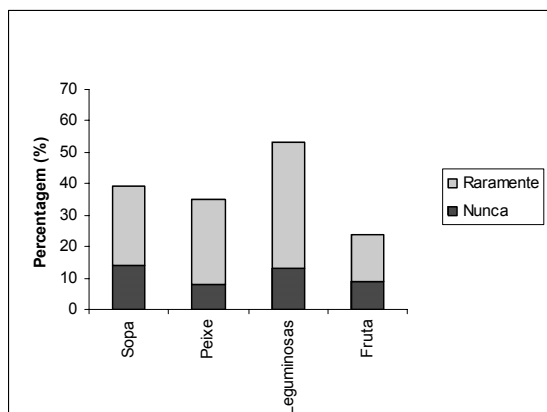


Figura 1 - Frequência de ingestão (%) de alimentos importantes numa alimentação saudável - Almoço

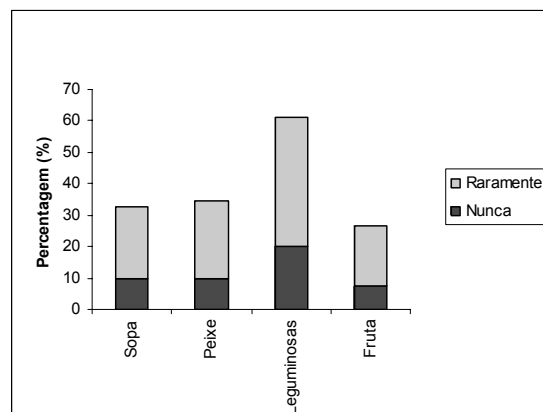


Figura 2- Frequência de ingestão (%) de alimentos importantes numa alimentação saudável - Jantar

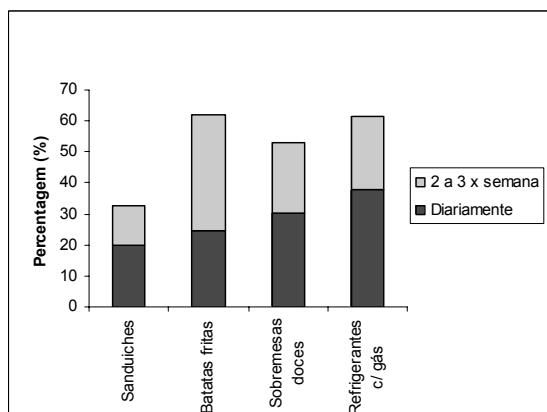


Figura 3 - Frequência de ingestão (%) de alimentos a evitar numa alimentação saudável - Almoço

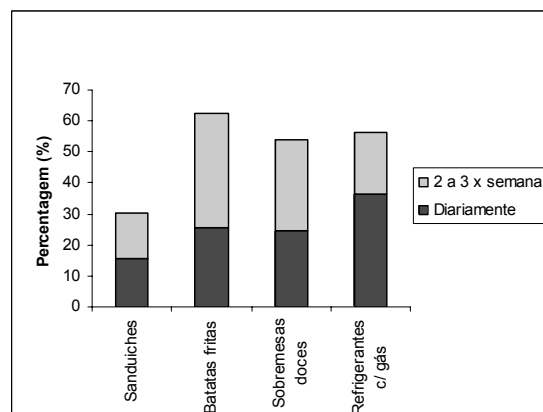


Figura 4- Frequência de ingestão (%) de alimentos a evitar numa alimentação saudável - Jantar

Salienta-se que cerca de 13,8% (A) e 10,0% (J) dos jovens nunca comem sopa e 25,2% (A) e 22,5% (J) dizem que o fazem raramente. A maioria diz ingerir peixe duas a três vezes por semana havendo, no entanto, 8,1% (A) e 9,9% (J) que referem nunca ingerirem peixe. É igualmente preocupante os 19,7% (A) e 15,5% (J) dos alunos que indicam, respectivamente, almoçar e jantar sanduíches diariamente. As leguminosas estão completamente ausentes da alimentação de cerca de 10,2% dos inquiridos e a fruta nunca está presente no almoço de 8,8% e no jantar de 7,5% dos jovens. Uma percentagem importante indica como alimentos ingeridos diariamente: as batatas fritas (A-24,4%, J-25,4%); as sobremesas doces (A-30,1%, J-24,8%), os refrigerantes com gás (A-37,9%, J-36,4%) e as bebidas alcoólicas (A-7,4%, J-3,4%).

A ingestão de guloseimas, sobretudo pastilhas, bolos e chocolates, apresenta valores muito elevados de frequente ingestão, como está evidente no gráfico da figura 5. Ingerem diariamente estes produtos, respectivamente 45,7%, 23,4% e 18,0% dos jovens.

Quando inquiridos sobre a forma de ocupação dos tempos livres, verifica-se que as raparigas adoptam actividades mais sedentárias, tais como ver televisão e ouvir música.

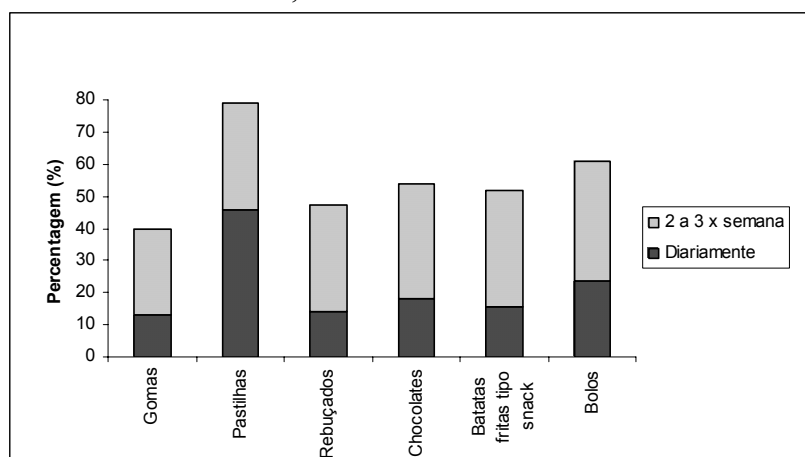


Figura 5 - Frequência de ingestão (%) de várias guloseimas.

Na segunda parte do inquérito em que se testam os conhecimentos dos jovens sobre o que é uma alimentação saudável, verifica-se que, de uma forma geral, os inquiridos sabem os princípios básicos de uma dieta saudável. Indicam correctamente os alimentos que se devem comer diariamente e referem, para os alimentos menos saudáveis, que devem ser consumidos raramente ou nunca.

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo revela que a alimentação dos jovens em estudo apresenta erros alimentares preocupantes tais como défice na ingestão de sopa, peixe, leguminosas e fruta. Também se verificou a frequente substituição das principais refeições (almoço e jantar) por sanduíches. Por outro lado, é evidente a excessiva frequência do consumo de alguns alimentos como as batatas fritas, as sobremesas doces e os refrigerantes com gás. Dada a faixa etária em estudo, os resultados encontrados para a ingestão diária de bebidas alcoólicas é também preocupante.

Relativamente a guloseimas verifica-se valores de frequência diária muito elevados tendo em conta que deveriam ser produtos a consumir esporadicamente, em dias festivos.

Estes hábitos alimentares menos correctos tomam particular relevância dado que, provavelmente, se prolongarão pela idade adulta.

Apesar de tudo, os inquiridos têm os conhecimentos básicos do que deve ser uma alimentação saudável, evidente na segunda parte do inquérito.

Os erros alimentares identificados não são o resultado da falta de conhecimentos sobre o que deve fazer parte duma alimentação saudável, mas sim duma escolha menos correcta, sem esquecer o papel fundamental que os pais ainda têm na escolha alimentar destes jovens.

## METAL COMPOSITION OF TABLE OLIVES FROM THE PORTUGUESE MARKET

*Soares<sup>1</sup>, E.; Bento<sup>2</sup>, A.; Bastos<sup>1</sup>, M. L.; Pereira<sup>2</sup>\*, J.A.*

<sup>1</sup> REQUIMTE/Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

<sup>2</sup> CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

\* [jpereira@ipb.pt](mailto:jpereira@ipb.pt)

Olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most important fruit trees in the Mediterranean countries. Their products, olive oil and also table olives, are important components of the Mediterranean diet and are largely consumed in the world. Table olives are well-known sources of compounds with important biological properties. The preparation of table olives follows three main trades, namely green or Spanish-style olives (Green Olives in Brine - GOB), black ripe or Californian-style olives (Black Ripe Olives), and naturally fermented olives (Direct Brined Olives – DBO). Heavy metals can be present in olive fruits for several reasons: endogenous, depending on the mineral constitution of the soils where the olive trees are located, or exogenous, resulting from the air pollution, contamination by phytochemical products and during technological processing. Besides the toxicological characteristics of these elements, the presence of transition metals in these fat matrices can negatively influence the organoleptic and nutritional properties as well as the shelf life of the products.

In this work, we present the quantification by Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry of aluminium, cadmium, chromium, copper, iron, lead and nickel in 34 table olive samples commercialized in Portugal submitted to different preparations. Eight samples were classified as GOB, seven as BRO, and all the others were DBO being seven of Galega cultivar (DBO – G), seven purchased in traditional market (DBO – tm) and five from olives in different maturation index – turning collar, (DBO – TC). The contents of metals in the edible fraction of table olives were 0.69-1.22 µg/g, 1.11-1.84 ng/g, 1.63-3.15 µg/g, 3.58-68.84 ng/g, 3.98-208.06 µg/g, 51.37-86.19 ng/g and 32.99-45.52 ng/g, for Al, Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, and Pb, respectively. The trade preparation showed an influence on the metal contents that justified the high content of Fe in BRO.

This work is supported by project INTERREG III A, Project MOABEPE “Identificación de los agentes patógenos y beneficiosos de los principales cultivos de las regiones fronterizas Trás-os-Montes y Castilla y León para la realización de estrategias de control razonadas”.

# O SISTEMA HACCP NO FABRICO DE BROA DE MILHO. UM CASO PRÁTICO.

*Romano<sup>1</sup>, C.; Batista<sup>2</sup>, M.; Pinto<sup>2</sup>, P.; Correia<sup>1</sup>, P.\**

<sup>1</sup>\*Escola Superior Agrária de Viseu. Quinta da Alagoa. Estrada de Nelas. 3500-606 VISEU. Tel +351232446600 Fax +351232426536 e-mail: [paulacorreia@esav.ipv.pt](mailto:paulacorreia@esav.ipv.pt)

<sup>2</sup>Fábrica do Pão. Zona Industrial da Abrunheira. Apartado 184- Vola Chã. 6270 186 Seia.

**Palavras-Chave:** Broa, HACCP, higiene, laboratório, equipamentos

**Resumo:** O sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) tem vindo a ser implementado nos vários sectores de produção de alimentos. Na empresa Museu do Pão, Seia, foi implementado no último ano. Este trabalho resultou do acompanhamento da implementação deste sistema no fabrico de broa de milho e na elaboração de um ante-projecto para a instalação de um laboratório de apoio à unidade fabril. Foram estabelecidos e cumpridos todos os pré-requisitos para a implementação do sistema, sendo posteriormente implementado o sistema HACCP, atendendo aos diferentes passos e etapas de modo a estabelecerem-se os pontos críticos de controlo, a sua monitorização e medidas correctivas. O ante-projecto do laboratório consistiu na adequação ao espaço disponível do mobiliário, equipamento e material diverso, de modo a satisfazer os requisitos estabelecidos pela empresa e pela legislação. Para isto efectuaram-se várias consultas sendo analisadas e avaliadas as várias propostas que foram recebidas, chegando-se assim à melhor solução para as condições em questão. Verificou-se que o investimento total para a implementação do laboratório, atendendo ao mobiliário, equipamentos e utensílios, seria de 24234.43€.

## 1. INTRODUÇÃO

Actualmente, garantir a qualidade dos produtos fornecidos, obter a satisfação, confiança e preferência dos clientes é extremamente essencial, de forma a melhorar o nível de formação e desempenho dos colaboradores e por fim preservar os recursos naturais, optimizando os processos produtivos. Para isso, as empresas têm de possuir sistemas de garantia de qualidade, nomeadamente as normas ISO 9000 e a ISO 22000, e de HACCP, de forma a satisfazer os requisitos dos seus clientes e as exigências regulamentares aplicáveis.

Este sistema não é mais que um instrumento, para que se analise pontos críticos e o controlo dos mesmos, para que não existam falhas, que iram ser prejudiciais tanto para o produtor como para o consumidor.

O sistema é dinâmico e evolutivo ajudando na detecção de áreas, devendo estar ao mesmo nível dos outros sistemas de gestão da qualidade na empresa.

O papel da administração da empresa é muito importante em todas as fases de implementação de modo a mostrar a todos os intervenientes o interesse do HACCP para o sucesso da empresa.

Depois de ser implementado, a empresa deve garantir a avaliação periódica do sistema, a formação continua e periódica.

Foi nesta dinâmica de trabalho que, a administração da Fábrica do Pão decidiu implementar na sua empresa alimentar de fabrico de pão um sistema de garantia da qualidade e também o HACCP, de forma a ser um elemento de referência e uniformização dos métodos e consequentemente, na satisfação do cliente e na optimização do desempenho interno.

Neste estudo, abordou-se a implementação do sistema HACCP na empresa Fábrica do Pão, abrangendo todas as etapas da produção e embalamento do produto broa, desde a recepção de matérias-primas e subsidiárias até à expedição.

Para existir um maior controlo da qualidade dos produtos e processos, a empresa decidiu também elaborar um ante-projecto para instalação de um laboratório de apoio à unidade industrial. A empresa já dispunha de um espaço destinado a esse fim. O estudo baseou-se na pesquisa das melhores soluções em termos de optimização do espaço, mobiliário, equipamentos e utensílios para os produtos em questão, nomeadamente a broa.

## **2. METODOLOGIA**

A metodologia utilizada foi o Sistema HACCP, é aplicado de uma forma sequencial por etapas, até à obtenção de um sistema de arquivo de dados, que posteriormente puderam contribuir para a certificação do produto, o que permite à empresa marcar destaque. Foram aplicadas as 7 etapas recomendadas para a implementação do sistema. O estudo abrangeu as etapas de produção/embalamento da broa de milho, desde a recepção das matérias-primas até à sua expedição.

Em termo legais os instrumentos de actuação deste processo são dados pelo Decreto-Lei n.º 67/98, de 18 de Março [1] e pelo Regulamento (CE) n.º 852/2004, de 30 de Abril [2], introduzem os instrumentos de análise dos perigos nas indústrias de transformação e produção de géneros alimentícios, através da determinação dos pontos críticos de controlo.

Para uma aplicação eficaz do sistema torna-se necessário a aplicação de determinadas condições de higiene alimentar, sem as quais o sistema não será viável. Para isso foi realizada uma check-list de verificação da eficácia e eficiência do plano de higienização.

No caso da instalação do laboratório na unidade fabril, foram realizadas várias consultas a empresas especializadas no ramo do mobiliário, equipamento e utensílios de laboratório atendendo nomeadamente ao espaço, tipo e finalidade do mesmo, bem como o produto e as características a analisar. O laboratório destina-se à realização de análises físico-químicas e microbiológicas dos produtos de panificação. Foram consultadas duas empresas especializadas em mobiliário de laboratório. Para os equipamentos e utensílios foram consultadas três empresas da especialidade, sendo-lhes apresentadas as características técnicas pretendidas pela empresa. Como as características técnicas foram definidas pela empresa Fábrica do Pão aquando da consulta, os parâmetros de avaliação das propostas foram os seguintes: assistência técnica, prazo de entrega, garantia, preço e condições de pagamento. A escala de pontuação aplicada foi unitária de 1 a 5, onde 1 corresponde a insatisfação e 5 satisfação máxima. A ponderação foi igual para os diferentes parâmetros de avaliação.

## **3. RESULTADOS**

Para se proceder à implementação do sistema a empresa teve de estabelecer e cumprir pré-requisitos, para além do treino e formação do pessoal, foram eles: boas práticas de fabrico, controlo das matérias-primas (através da certificação dos seus fornecedores), boas práticas de higiene (nomeadamente a existência de um plano de limpeza e desinfecção) e o controlo de pragas. Constatou-se, após a realização de uma verificação a estes pré-requisitos, que estava tudo conforme o definido.

A equipa HACCP foi formada, tendo como função o estudo, coordenação e implementação, do sistema no processo de elaboração da broa de milho (Figura 1). Foram seguidos todas as etapas recomendadas e o sistema foi implementado com sucesso. Os PCCs encontrados foram os seguintes: armazenamento e pesagem das matérias-primas, a mistura de sólidos, a amassadura e ao tender da massa, a cozedura e arrefecimento, filmagem e por último a codificação.

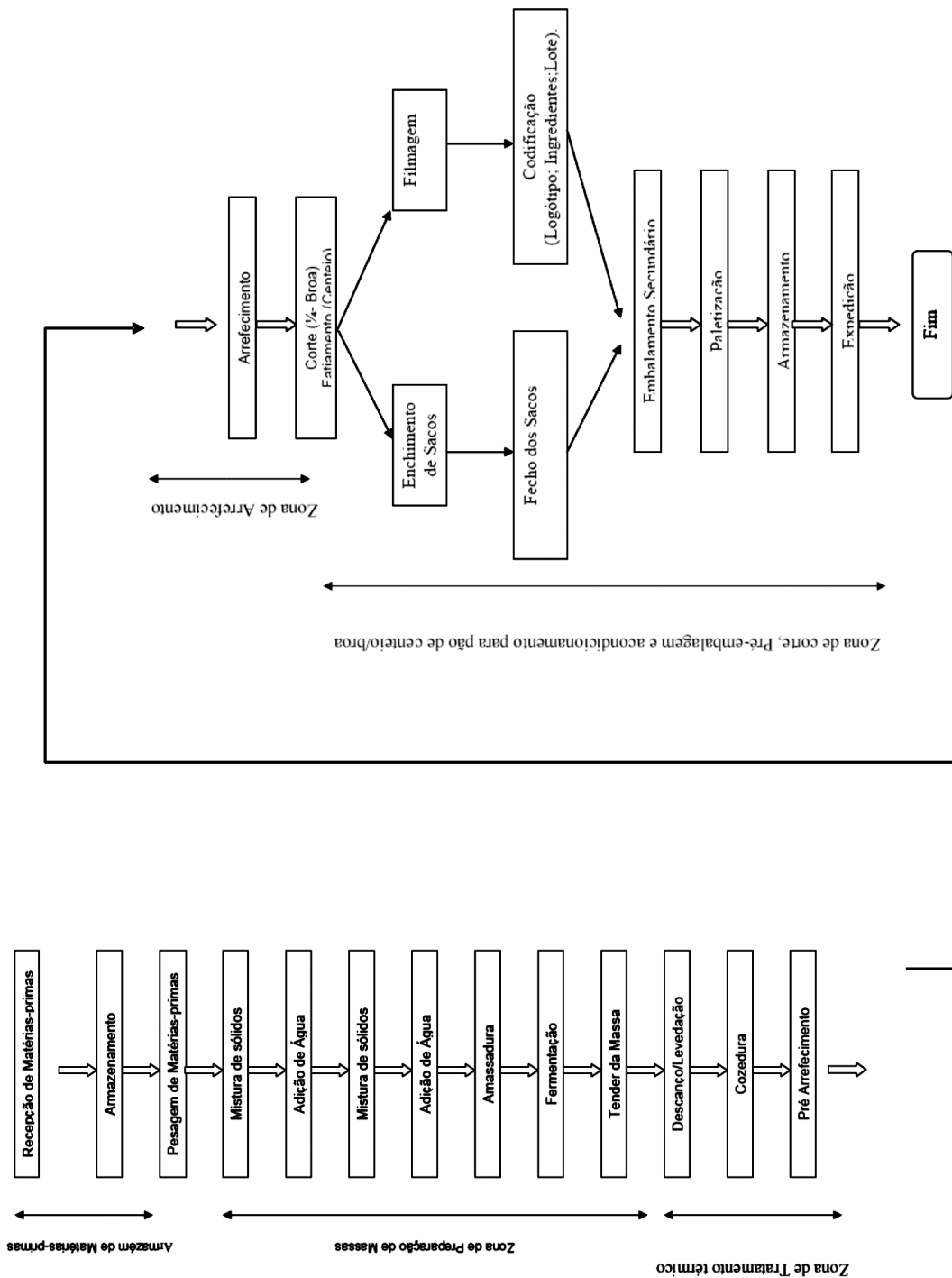
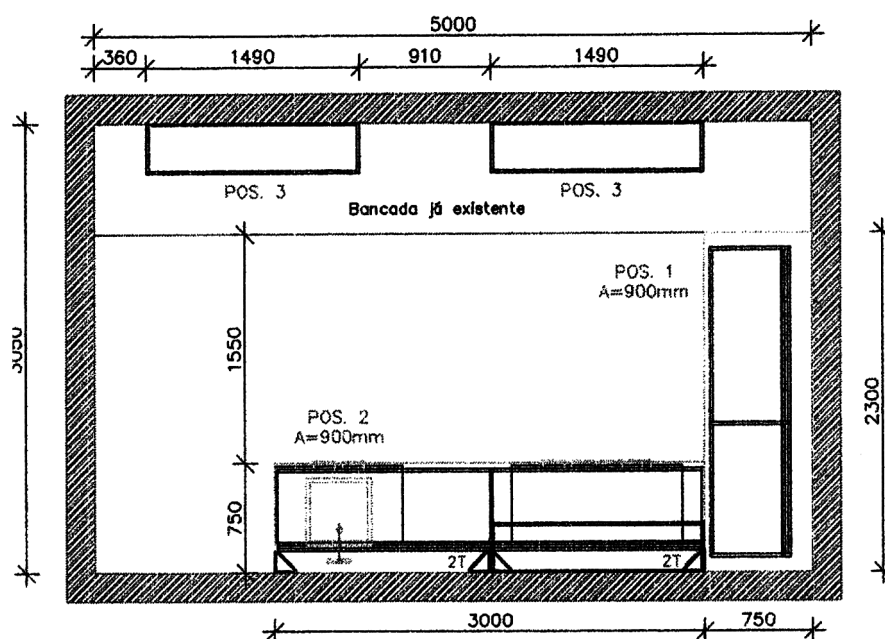


Figura 1 – Diagrama de panificação da broa de milho

Quanto ao ante-projecto de instalação do laboratório, na Figura 2 encontra-se representada a planta geral do laboratório com o respectivo mobiliário, após a análise das duas propostas apresentadas nas empresas consultadas.



**Figura 2** – Planta do laboratório com a disposição do mobiliário (escala 1:50)

No Quadro 1 encontram-se representados os valores orçamentais finais, após análise e escolha da melhor proposta, para o mobiliário, equipamento e utensílios.

**Quadro 1** – Orçamento total do investimento (valores de Setembro de 2006).

|                                 | VALOR<br>(Euros) |
|---------------------------------|------------------|
| Mobiliário                      | 6170,00          |
| Equipamento                     | 13506,76         |
| Material de vidro               | 656,56           |
| Material e equipamento genérico | 3901,11          |
| <b>TOTAL</b>                    | <b>24234,43</b>  |

Pela análise do quadro podemos verificar que o maior investimento é no equipamento a adquirir, correspondendo a 55,7% do total do investimento, correspondendo 56% deste valor a três equipamentos: o autoclave, a câmara de fluxo laminar e o homogeneizador de amostras.

#### 4. CONCLUSÃO

Foi possível fazer o acompanhamento da instalação do sistema HACCP ao longo do processo de fabrico da broa de milho, ficando o mesmo completo no final deste estudo.

Relativamente ao ante-projecto de instalação do laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas, a empresa ficou a dispor de um caderno de encargos, especificando tanto para o mobiliário como para os equipamentos e utensílios o seu valor como as suas características, indicando as melhores opções.

#### Referências

- [1] Decreto-Lei n.º 67/98. Diário da Republica n.º 100, 1155-1163.
- [2] Regulamento (CE) n.º 852/2004. Jornal Oficial da União Europeia L 139.



# PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SENSORIAL EM AZEITONA DE MESA DA CULTIVAR ‘AZEITEIRA’: ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO COM *Lactobacillus pentosus*

Silva, S.<sup>1,2</sup>, Fernandes, J.<sup>1,3</sup>, Pintado, C.<sup>5</sup>, Catulo, L.<sup>6</sup>, Peres, C.<sup>5,6</sup>, Bronze, M.R.<sup>1,2,4\*</sup>

1 Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2780 – 901 Oeiras,

2 Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127 2780 – 901 Oeiras,

3 Escola de Tecnologia e Gestão Industrial, Estrada Octávio Pato, 2635 – 631 Rio de Mouro;

4 Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas 1649 – 019 Lisboa.

Tel +351 217946400 Fax +351 217946470 e-mail: [mbronze@ff.ul.pt](mailto:mbronze@ff.ul.pt)

5 INIAP/ENMP, Dept. Olivicultura, 7350 Elvas, Portugal.

6 INIAP/EAN, Qta do Marquês, 2784 – 505 Oeiras, Portugal

**Palavras-chave:** azeitona de mesa, compostos fenólicos, HPLC, sensorial

**Resumo:** Estudou-se a aplicação de um inóculo da estirpe *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 no controlo da fermentação de azeitona de mesa estilo sevilhano da cultivar portuguesa ‘Azeitona’ e o seu efeito na composição fenólica e na apreciação sensorial do produto. Neste âmbito, foram testados inóculos sob a forma de líofilo e células suspensas em meio nutritivo.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram analisados por cromatografia de fase líquida (HPLC) utilizando os detectores de díodos e electroquímico. O doseamento de compostos fenólicos totais foi efectuado utilizando um método espectrofotométrico.

Foram identificados compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos álcoois fenólicos como o hidroxitirosol e tirosol. O recurso à detecção electroquímica mostrou ser importante na identificação de compostos fenólicos com actividade antioxidante, como o hidroxitirosol.

Os resultados encontrados permitem caracterizar as amostras em estudo (fruto fresco e frutos fermentados) no que respeita à composição fenólica. Sensorialmente, os produtos finais resultantes dos processos de fermentação natural e induzida obtiveram classificações semelhantes, com classificações entre “Boa” e “Muito boa”.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de azeitona de mesa consiste numa fermentação ácido láctica baseada, tradicionalmente, num processo espontâneo no qual os frutos são preparados de forma a favorecer a fermentação ácido láctica. O controlo da fermentação das azeitonas em salmouras constitui um problema importante. Daí, a necessidade de aplicação de procedimentos controlados que conduzam a melhoramentos tecnológicos do processo que promovam a fermentação ácido láctica das azeitonas, prevenindo a degradação do produto final e proporcionando a obtenção de um produto de qualidade elevada.

Neste trabalho foram estudadas, no que respeita à composição fenólica e apreciação sensorial, amostras de azeitonas obtidas por fermentação natural e fermentação controlada por recurso à aplicação de inóculos de *Lactobacillus pentosus* na forma liofilizada e células suspensas em meio nutritivo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### *Preparação das amostras de azeitona tipo verde estilo sevilhano*

Na campanha de 2005, foi colhida azeitona verde da cultivar ‘Azeitona’ a 29 de Setembro, num olival de Protecção Integrada situado na região de em Campo Maior (Norte Alentejo). Os frutos foram submetidos a um processo prévio de limpeza e foram classificados numa

unidade industrial da região. Os frutos usados nos ensaios foram classificados de primeira classe [1].

A preparação da azeitona tipo verde estilo sevilhano consistiu na imersão dos frutos numa solução de hidróxido de sódio de 1,5% (m/v) até que o NaOH penetrou, aproximadamente, 2/3 da espessura da polpa das azeitonas, num processo de lavagem e na colocação em salmoura a 8,0% de NaCl (m/v) para fermentação. A temperatura da sala de fermentação, durante o ensaio, foi de 25-30 °C. Após 5 dias de fermentação, o inóculo de *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 foi adicionado nas formas liofilizada e de células suspensas em meio nutritivo MRS (Oxoid); a quantidade a adicionar foi calculada de forma a obter uma concentração de  $10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> em cada recipiente de fermentação. Foram utilizados dois fermentadores para cada modalidade de fermentação: testemunha, adição do inóculo liofilizado e adição das células suspensas em meio nutritivo. Após dois meses de fermentação foram retiradas amostras para posterior análise.

#### *Pré-tratamento das amostras de azeitona para análise de compostos fenólicos*

Foram preparadas polpas de azeitona, moídas com triturador doméstico, após remoção prévia dos endocarpos. Foram preparados extractos hidrometanólicos das polpas, segundo um método descrito anteriormente [2].

## **2.2 Métodos**

#### *Teor total de compostos fenólicos*

Aos extractos de polpa de azeitona, diluídos, foi adicionado reagente de Foli-Denis, e solução aquosa de carbonato de sódio 20%, em balão volumétrico. Após 45 minutos perfez-se o volume do balão e o teor total de compostos fenólicos foi determinado colorimetricamente a 760 nm.

#### *HPLC com detecção por díodos (DAD) e electroquímico (EQ)*

As análises por HPLC foram realizadas num equipamento Thermo Finnigan (San José C.A., EUA) – Surveyor associado a um detector de díodos Surveyor® PDA (Thermo Finnigan), a um detector electroquímico ED40 (Dionex) com eléctrodo de carbono vítreo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Lichrospher 100 RP-18, diâmetro da partícula 5 µm (250 mm x 4 mm diâmetro interno), Merck, com uma pré-coluna RP-18 (Merck), diâmetro da partícula 5 µm, mantida a 35°C. Utilizou-se um fluxo de eluente de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. Utilizou-se um método de gradiente com dois eluentes: A – água:ácido fosfórico (99,9:0,1, v/v); B – água:acetonitrilo:ácido fosfórico (59,9:40,0:0,1, v/v/v), utilizando um método descrito anteriormente [2]. A detecção com o detector de díodos foi efectuada com aquisição de dados no ultravioleta a 254, 280 e 320 nm. O detector electroquímico estava programado para trabalhar no modo de amperometria integrada para uma variação de potencial de -1.0 mV em 1.00 s.

#### *Análise sensorial das azeitonas de mesa*

A análise sensorial do produto final foi efectuada por um painel constituído por 5 provadores. A apreciação global foi efectuada tendo em conta a seguinte pontuação: 1 – Péssima; 2 - Muito má; 3 – Má; 4 - Mediocre; 5 - Regular; 6 - Boa; 7 - Bastante Boa; 8 - Muito Boa; 9 - Excelente. Num segmento de recta não estruturado de 10 cm assinalou-se a pontuação atribuída às sensações negativas (fermentação anormal, bolor ou mofo, ranço, cozido ou

queimado, outros defeitos), às sensações gustativas (salgado, amargo, ácido) e à firmeza, esclarecendo que o meio deste segmento corresponde ao ótimo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teor total de compostos fenólicos

O teor total de compostos fenólicos determinado para o fruto fresco foi de 30 g/kg, expresso em ácido tânico. Os produtos finais obtidos, após fermentação natural (testemunha) e fermentação controlada por adição de inóculo, apresentaram naturalmente valores mais baixos para este parâmetro, nomeadamente: fermentação natural – 17 g/kg, fermentação controlada com líofilo – 23 g/kg e fermentação controlada por adição de inóculo de células suspensas em meio nutritivo – 24 g/kg.

#### 3.2 Análise cromatográfica

Na figura 1 apresentam-se os cromatogramas obtidos, por HPLC com detecção a 280 nm, após análise dos extractos de frutos fresco e produto final fermentado. Na mesma figura identificam-se os álcoois fenólicos, como o hidroxitirosol e tirosol e a luteolina-7-glucósido pertencente ao grupo fenólico dos flavonóides. Verifica-se uma alteração do perfil cromatográfico do fruto fresco para os frutos fermentados, associado à fermentação e consequente passagem de compostos fenólicos do fruto para a salmoura. O aumento dos teores de hidroxitirosol e tirosol verificados são consequência da degradação de componentes fenólicos típicos da azeitona como a oleuropeína e ligstrósido, respectivamente. Para o produto final obtido com inóculo em meio nutritivo verificou-se, relativamente aos outros produtos finais, um aumento dos níveis detectados de luteolina-7-glucósido e de um componente detectado ao tempo de retenção aproximado de 59 min.

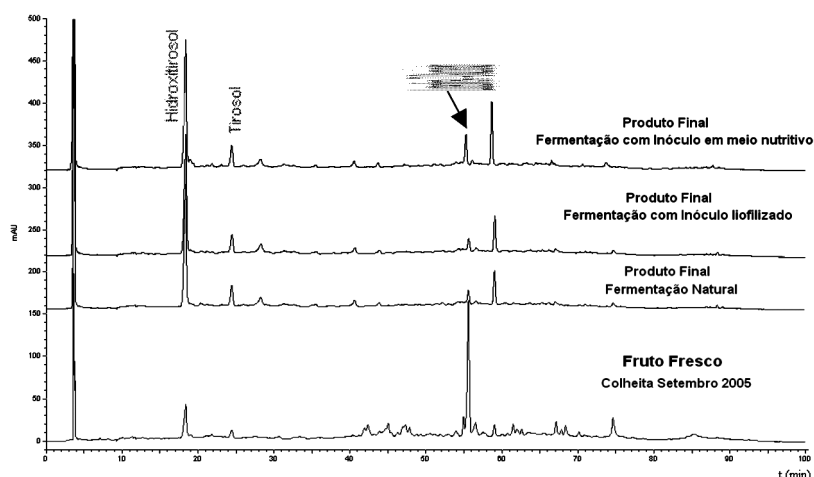
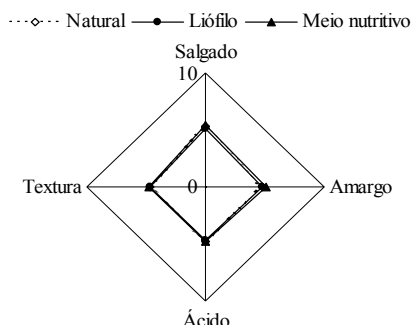


Figura 1 – Cromatogramas a 280nm de extractos de polpa de azeitona: fruto fresco e produtos finais. Os perfis cromatográficos obtidos com detecção electroquímica destacam a actividade electroquímica do hidroxitirosol.

#### 3.3 Avaliação sensorial

Os provadores atribuíram classificações semelhantes aos produtos resultantes dos processos controlados por inoculação e natural. Na apreciação global registaram-se classificações entre “Boa” e “Muito boa” correspondentes, respectivamente, a “azeitonas com defeitos leves e quase imperceptíveis” e “azeitonas típicas de boa qualidade”. Relativamente à percepção das sensações negativas, registaram-se valores próximos de zero indicando a sua ausência. Aos atributos gustativos, salgado, amargo e ácido, e à firmeza, os provadores atribuíram valores

médios de aproximadamente 5. Como podemos observar na Figura 2, os perfis sensoriais das azeitonas de mesa resultantes de fermentação natural e de fermentação controlada com adição de *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 sob as formas liofilizada e suspensão em meio nutritivo sobrepõem-se.



**Figura 2** – Perfil sensorial de azeitona de mesa obtida a partir de fermentação natural e fermentação controlada com adição de *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 sob as formas liofilizada e suspensão em meio nutritivo

## CONCLUSÕES

Neste trabalho a utilização dos detectores de díodos e electroquímico hifenados ao HPLC mostrou ser útil e complementar, na identificação de compostos fenólicos detectados. Destaca-se a actividade electroquímica do hidroxitirosol detectado nestas amostras, o que reforça a análise deste tipo de matrizes alimentares na pesquisa e estudo de compostos com actividade antioxidante. Os resultados revelam que a inoculação com *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 em meio nutritivo e na forma liofilizada não afecta de forma importante o perfil sensorial. No que respeita aos compostos fenólicos os cromatogramas obtidos para os produtos finais destacam diferenças do produto final obtido com inoculo em meio nutritivo, quando comparado com os restantes produtos finais.

## Referências

- [1] – NP-3034 - Norma Portuguesa. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação. 17pp (1987).
- [2] – S. Silva – Compostos Fenólicos em Amostras de Cultivares de Oliveira (*Olea europaea* L.), Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa (2004).

## Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto Agro 463 - Acção 8.1, Medida 8 do Programa AGRO.

# PERFIL MICROBIOLÓGICO DO QUEIJO DO PICO AO LONGO DA MATURAÇÃO

*Dapkevicius, M. L. N.E.\*; Imperatori, M. P., Dapkevicius, A. e Silva, C. C. G.*

CITA-A, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Terra Chã, 9701-851 Angra do Heroísmo, Açores, Portugal

Tel +351-295 402 200 Fax + 351-295 402 205 e-mail: mariaenes@notes.angra.uac.pt

**Palavras-chave:** microflora, queijo artesanal, proteólise, lipólise, produtos tradicionais açorianos

**Resumo:** O queijo do Pico, um dos dois queijos Portugueses de leite de vaca com estatuto DOP, é um elemento importante da cultura gastronómica dos Açores e é muito apreciado pelos consumidores locais. Os alimentos tradicionais constituem reservatórios de biodiversidade microbiana cujo futuro é incerto. O estudo dos seus perfis microbianos pode evitar perdas de biodiversidade e permitir a obtenção de microrganismos com potencialidades como culturas de arranque ou culturas adjuntas. Ainda não foram publicados dados sobre o perfil microbiológico do queijo do Pico. O objectivo deste trabalho foi estudar as populações microbianas durante os 21 dias de maturação deste queijo tradicional açoriano e pesquisar a actividade proteolítica e lipolítica dos microrganismos isolados.

Foram analisadas amostras de nove lotes de queijo, provenientes de três queijarias, durante o período de maturação (ao fim de 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias). Para cada amostra, procedeu-se à contagem de mesófilos aeróbios, leveduras, bactérias halotolerantes e presumíveis lactococos, lactobacilos, leuconostoc e enterococos. Obtiveram-se isolados de cada grupo bacteriano e estudou-se a sua actividade proteolítica e lipolítica.

O queijo do Pico apresentou elevados números de microrganismos durante toda a maturação. Os lactococos foram as bactérias predominantes, atingindo populações ligeiramente superiores a  $10^9$  ufc  $g^{-1}$ . Os lactobacilos e leuconostoc encontravam-se presentes em números inferiores ( $10^8$  ufc  $g^{-1}$ ). Os enterococos apresentaram números superiores a  $10^7$  ufc  $g^{-1}$ . Provavelmente devido a este queijo ser feito a partir de leite cru e devido ao curto período de maturação (21 dias), as populações bacterianas estudadas sofreram alterações inferiores a um ciclo logarítmico durante o período em estudo. As populações de leveduras, contudo, variaram consideravelmente (entre  $10^3$  e  $10^7$  ufc  $g^{-1}$ ), com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre queijarias, lotes e dias de maturação. Muitos isolados apresentaram actividade proteolítica, mas a actividade lipolítica não era comum.

## 1. INTRODUÇÃO

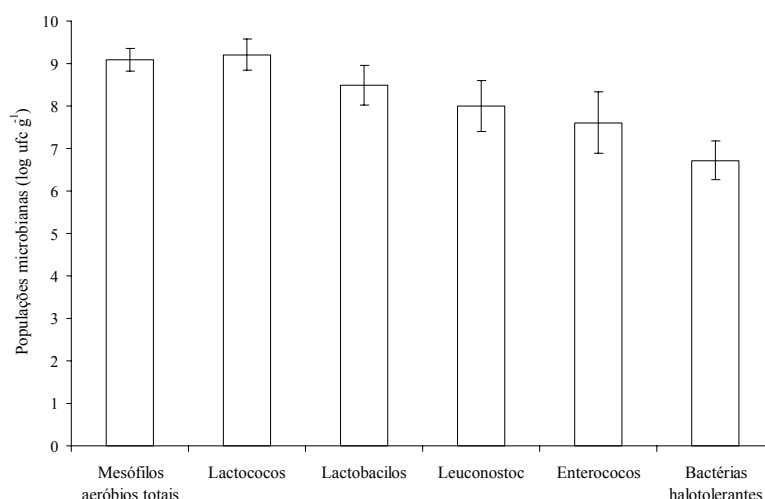
O queijo do Pico é um dos dois queijos portugueses fabricados a partir de leite de vaca que têm estatuto D. O. P. Este queijo é produzido artesanalmente na Ilha do Pico, Açores, a partir de leite cru, sem a adição de qualquer cultura de arranque. É um queijo de consistência mole pastosa, tendo a pasta cor branca amarelada, com olhos, pouco compacta e muito untuosa, obtido por esgotamento lento da coalhada, após coagulação do leite cru de vaca, por acção de coalho animal. Comercialmente pode apresentar-se com um diâmetro de 16 a 17 cm, altura de 2 a 3 cm e com peso compreendido entre 650 a 800 g. A cura é curta, não excedendo as três semanas. Apesar de existirem estudos publicados sobre muitos outros queijos D. O. P. portugueses<sup>1</sup>, não foram, até ao presente, publicados trabalhos sobre o queijo do Pico. Para que este produto tradicional, altamente apreciado pelos consumidores açorianos e que é parte integrante da cultura gastronómica do arquipélago, possa ser preservado, importa estudá-lo. A promoção dos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru requer um conjunto de padrões contemplando as práticas produtivas e as características do produto final que só podem ser obtidas como resultado dum esforço de investigação intenso e coordenado<sup>1</sup>. Nesta óptica, o presente trabalho teve como objectivos contribuir para a preservação e melhoria da

qualidade do queijo do Pico, bem como para a preservação da biodiversidade microbiana deste ambiente único.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparou-se três lotes de queijo pelo processo tradicional, com intervalos de um mês, em três queijarias situadas na Ilha do Pico, Açores. Ao fim de 0, 1, 3, 7, 14 e 21 dias de maturação, retiraram-se dois queijos de cada lote e de cada produtor (108 queijos analisados). Procedeu-se à contagem de mesófilos aeróbios (em Plate Count Agar, Merck), de leveduras (em Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Merck), bactérias halotolerantes (em Mannitol Salt Phenol Red Agar, Merck), presumíveis enterococos (em KF Agar, Biokar), leuconostocs (em MSE Agar, Biokar), lactococos (em M17 Agar, Biokar) e lactobacilos (em Rogosa Agar, Merck). A partir das placas das diluições contáveis para cada meio e cada amostra, isolaram-se dez colónias. Testou-se a capacidade proteolítica e lipolítica de isolados seleccionados de cada grupo em estudo em Skim Milk Agar (Merck) e em Tributyrin Agar (Merck), respectivamente. Com recurso a uma folha de cálculo, prepararam-se tabelas ANOVA para os resultados de cada grupo microbiano, com o objectivo de avaliar a significância dos efeitos das queijarias, lotes e dias de maturação.

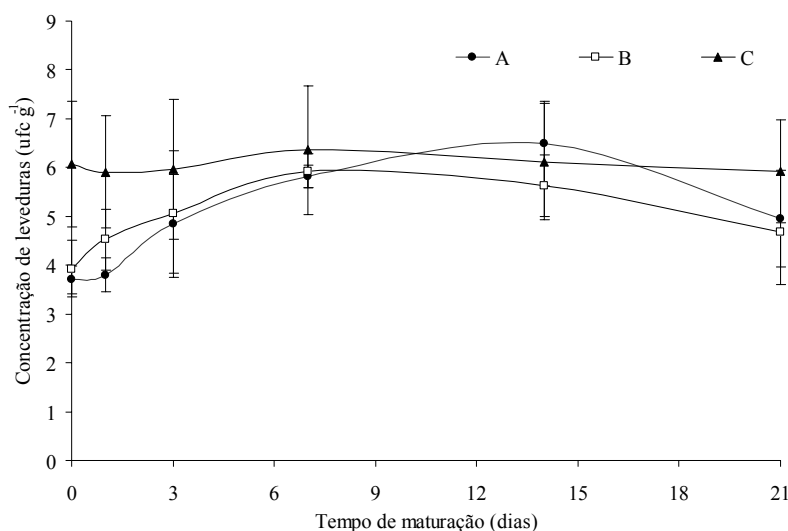
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 1** – Contagens de bactérias em amostras de queijo do Pico. As barras representam as médias e as barras de erro o desvio padrão (n=54).

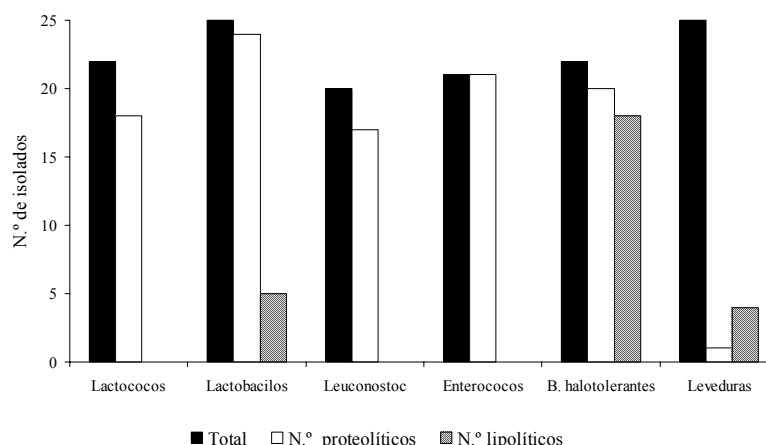
Na figura 1 apresentam-se os resultados das contagens bacterianas. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nem entre queijarias, nem entre lotes, nem entre dias de maturação. Durante os 21 dias estudados, o queijo do Pico apresentou sempre contagens bacterianas elevadas. Em média, os mesófilos aeróbios totais atingiram os  $9,1 \pm 0,27 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . O grupo bacteriano predominante foram os lactococos, que atingiram concentrações de  $9,2 \pm 0,4 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . Os lactobacilos e leuconostoc atingiram concentrações de, respectivamente,  $8,5 \pm 0,5$  e  $8,0 \pm 0,6 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . Os enterococos apresentaram concentrações de  $7,6 \pm 0,7 \log \text{ ufc g}^{-1}$ , enquanto que as bactérias halotolerantes atingiram  $6,7 \pm 0,5 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . Embora seja difícil comparar os resultados obtidos com os doutros estudos, porque o queijo do Pico tem a particularidade de ter um período de maturação muito curto em relação a certas

outras variedades de queijo produzidas a partir de leite cru, outros queijos ibéricos apresentaram também contagens elevadas de bactérias do ácido láctico durante toda a sua maturação<sup>2,3,4</sup>. Os enterococos e as bactérias halotolerantes também fazem parte da microflora doutros queijos produzidos à base de leite cru<sup>4</sup>.



**Figura 2** – Contagens de leveduras em amostras de queijo do Pico proveniente de três queijarias (A, B e C). Os pontos representam as médias e as barras de erro os desvios-padrão (n=3).

Observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quanto às populações de leveduras entre queijarias, lotes e dias de maturação. Os resultados das contagens de leveduras apresentam-se na figura 2. A queijaria C apresentou sempre concentrações elevadas de leveduras durante toda a maturação. Nas outras duas queijarias, as concentrações de leveduras aumentaram inicialmente cerca de dois ciclos logarítmicos, tendo em seguida voltado a sofrer um decréscimo. As contagens de leveduras no queijo do Pico foram inferiores às de LAB, o que também se verificou noutros queijos tradicionais ibéricos produzidos a partir de leite cru<sup>4</sup>.



**Figura 3** – Actividade proteolítica e lipolítica de isolados microbianos obtidos durante a maturação de queijo do Pico.

Obtiveram-se 320 isolados bacterianos e 75 isolados de leveduras a partir do primeiro lote de queijo do Pico preparado pelas três queijarias, tendo-se procedido à avaliação das suas actividades proteolítica e lipolítica. Os resultados desta avaliação encontram-se na figura 3. A

maioria dos isolados bacterianos apresentaram actividade proteolítica, mas apenas um dos isolados de leveduras foi capaz de degradar a caseína nas condições deste ensaio. Não houve isolados lipolíticos de lactococos, leuconostocs e enterococos. Vinte por cento dos lactobacilos e a maioria (90%) das bactérias halotolerantes apresentaram actividade lipolítica. Nenhum dos presumíveis lactococos nem dos presumíveis enterococos isolados apresentaram actividade lipolítica. A actividade lipolítica foi pouco comum nos isolados de leveduras. Apenas 4 isolados de leveduras apresentaram actividade lipolítica nas condições experimentais deste trabalho. Os resultados do estudo da actividade proteolítica e lipolítica dos isolados obtidos a partir do queijo do Pico vão ao encontro do que tem sido descrito noutros trabalhos. Sabe-se que as LAB têm actividade proteolítica, ainda que fraca<sup>5</sup>. Os enterococos foram descritos como o grupo de microrganismos com maior actividade proteolítica no queijo Montasio<sup>6</sup>, enquanto que poucas das leveduras isoladas de queijo Fiore Sardo apresentavam actividade proteolítica e lipolítica<sup>7</sup>. A actividade lipolítica tem sido também descrita em lactobacilos e enterococos<sup>8</sup>. Em relação às bactérias halotolerantes, noutros tipos de queijo, verificou-se que muitas destas bactérias possuíam actividade lipolítica e proteolítica<sup>3</sup>.

Este trabalho permitiu verificar que o queijo do Pico possui populações numerosas de bactérias do ácido láctico, entre as quais predominam os lactococos, logo desde o início da maturação. Existem ainda populações consideráveis de bactérias halotolerantes e de enterococos. Tal como noutros tipos de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, as leveduras estão também presentes, mas em menores números. As populações bacterianas poderão desempenhar um papel importante na proteólise do queijo do Pico, mas apenas os lactobacilos e as bactérias halotolerantes apresentaram actividade lipolítica.

### Referências

- [1] – C. Freitas, F.X. Malcata – *J. Dairy Sci.* **83** (2000) 584
- [2] – M. R. Medina, M. E. Tornadizo, J. Carballo, R. M. Sarmiento – *J. Food Prot.* **58** (1995) 1006
- [3] – J. A. Centeno, S. Menendez, J. L. Rodriguez-Otero – *Int. J. Food Microbiol.* **33** (1996) 307
- [4] – F. K. Tavora, F. X. Malcata – *Food Microbiol.* **17** (2000) 304
- [5] – P. L. H. McSweeney, M. J. Sousa – *Lait* **80** (2000) 293
- [6] – M. Marino, M. Maifreni, G. Rondinini – *FEMS Microbiol. Lett.* **229** (2003) 133
- [7] – M. E. Fadda, V. Mossa, M. B. Pisano, M. Deplano, S. Cosentino – *Int. J. Food Microbiol.* **95** (2004) 51
- [8] – A. C. Freitas, A. E. Pintado, M. E. Pintado, F. Xavier Malcata – *Int. Dairy J.* **9** (1999) 593
- [9] – J. F. Chich, K. Marchessau, J. C. Gripon – *Int. Dairy J.* **7** (1999) 169



# PRESENÇA DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS COMPOSTOS PARA ANIMAIS NA ÚLTIMA DÉCADA EM PORTUGAL – UMA REVISÃO

*Martins<sup>1\*</sup>, H.M.; Saldanha<sup>2</sup>, C.; Marques<sup>1\*</sup>, M.; Ferreira<sup>1</sup>, S.; Guerra<sup>3,4</sup>, M.M.; Bernardo<sup>4</sup>, F.*

<sup>1</sup>Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Serviço de Micologia, Estrada de Benfica, 701 1549, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> INETI/DTIA\_UQA - Estrada do Paço do Lumiar, 22 1649-038 Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril

<sup>4</sup>Laboratório de Inspeção Sanitária / CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Pólo Universitário da Ajuda – Rua Professor Cid dos Santos, 1300-147 Lisboa, Portugal

Telefone: 21 71153 36; Fax: 21 71153 84; E-mail: [marina.martins@lniv.min-agricultura.pt](mailto:marina.martins@lniv.min-agricultura.pt); [coimbra.mm@gmail.com](mailto:coimbra.mm@gmail.com)

**Palavra chave:** alimentos compostos, animais, micotoxinas

## 1. RESUMO

O controlo micotoxicológico dos alimentos compostos para animais é um procedimento que tem por objectivo proteger a saúde dos animais, evitando os efeitos adversos destas substâncias indesejáveis. Esta componente do controlo sanitário das rações é fundamental para evitar a presença de substâncias tóxicas que podem afectar gravemente a saúde dos animais e inclusivamente, do Homem. Em Portugal existe pouca informação relacionada com a ocorrência natural de micotoxinas em alimentos compostos para animais e a que existe, encontra-se dispersa e difícil de interpretar à luz dos novos desenvolvimentos que se têm assistido, nomeadamente no que concerne aos aspectos legislativos e metodológicos associados ao tema. Neste contexto apresentam-se os dados da monitorização de rações para bovinos de leite, suínos, equinos e de galinhas poedeiras obtidos ao longo da última década, com vista a uma apreciação qualitativa dos riscos associados à presença de micotoxinas nestes alimentos. Os autores abordam ainda os procedimentos metodológicos adoptados, discutem as implicações da presença das toxinas nos referidos alimentos e ainda as consequências práticas da implementação da nova legislação referente à presença de micotoxinas nos alimentos compostos para animais.

## 2. INTRODUÇÃO

Entre os perigos sanitários de natureza química que podem ser veiculados pelos alimentos, as micotoxinas representam, seguramente, um dos mais frequentes e um dos de maior gravidade. Variando com a exposição a que os consumidores estão sujeitos e a respectiva condição física, as micotoxinas podem desencadear múltiplos efeitos adversos à saúde, traduzidos em situações de intoxicação aguda, sub-aguda e crónica. O efeito adverso mais preocupante, e provavelmente o que está menos avaliado, mas sendo certamente o mais comum, é precisamente o que resulta da exposição a doses inferiores às que são necessárias para causar efeitos tóxicos detectáveis, e cujas consequências são o desencadeamento de estados de imunodepressão [1]. Estes estados de fragilização das defesas imunitárias, predispõem os Animais e o Homem a infecções oportunistas e a uma evolução rápida das neoplasias [2]. Na actualidade, tal como então, a essência do problema reside nas condições da produção agrícola e do armazenamento dos cereais e de outras matérias-primas, sobretudo as de origem vegetal (leguminosas e oleaginosas). A grande diferença, nos nossos dias, decorre do facto de os efeitos das micotoxinas serem ampliados e multiplicados pelas necessidades de abastecimento massivo em matérias-primas para rações usadas na produção animal intensiva: O risco decorrente da contaminação dos alimentos por micotoxinas depende, antes de mais, da natureza de cada uma das substâncias tóxicas presentes, da dose de metabolito ingerida,

das condições físicas do animal atingido, da capacidade de metabolização do organismo atingido (susceptibilidade específica) [3]e[4].

Inquietante é, portanto, o facto de algumas micotoxinas veiculadas pelos alimentos dos animais, poderem passar para o leite e para os ovos ou permanecerem como resíduo na carne e vísceras. Ainda que o nível desses resíduos possa ser muito reduzido, o facto de contaminarem alimentos para recém-nascidos e crianças em regime láctico exclusivo, agrava substancialmente o risco de se registarem efeitos mórbidos. O extenso rol de malefícios que são atribuídos às micotoxinas foi construído em apenas 40 anos de pesquisa científica, no entanto a associação das decomposições fúngicas dos alimentos com o aparecimento de doenças no Homem tem uma história mais longa. Obviamente que nem todas as micotoxinas representam o mesmo nível de risco para a saúde dos animais ou das pessoas. Esse nível de risco é influenciado por diversos factores sendo os mais importantes a toxicidade específica das moléculas e o nível de exposição dos consumidores.

No que concerne à exposição dos consumidores ao risco de micotoxicose, pode afirmar-se que ela depende da frequência com que se ingerem alimentos contaminados, do nível de contaminação ou do teor de cada micotoxina nas matérias-primas ou dos produtos usados na alimentação animal e da susceptibilidade biológica intrínseca [2].

### 3. AFLATOXINAS, OCRATOXINA, DEOXINIVALENOL E FUMONISINAS-SITUAÇÃO NAS RAÇÕES PRODUZIDAS E COMERCIALIZADAS EM PORTUGAL

Em Portugal, existe pouca informação relacionada com a ocorrência natural de micotoxinas em geral em alimentos compostos para animais. Os poucos registos existentes datam desde finais da década de 70.

No que respeita às matérias-primas utilizadas no fabrico de rações, verifica-se que esta tem sido afectada pelas restrições decorrentes da utilização de farinhas de carne no fabrico de rações para mamíferos na Europa. A substituição dessas fontes proteicas por outras de origem vegetal com taxas de incorporação superiores ao que era usual, introduz um factor de risco suplementar à ocorrência de micotoxinas nas rações para animais (Quadro 2).

**Quadro 2** - Ocorrência de micotoxinas em matérias-primas (N=513) em Portugal de 2000 a 2003 [5] e[6]

|              | <b>Aflatoxina B1</b> |               | <b>Deoxinivalenol</b> |                | <b>Fumonisina B1</b> |              |
|--------------|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|----------------------|--------------|
|              | n+/N                 | µg/kg         | n+/N                  | µg/kg          | n+/N                 | µg/kg        |
| Soja         | 2/66                 | 1 - 10        | 0/26                  | -              | 0/26                 | -            |
| Arroz        | 9/17                 | 5 - 20        | 3/17                  | 100-200        | 1/17                 | 15           |
| Milho        | 30/248               | 1- 45         | 8/58                  | 100-500        | 12/58                | 10-300       |
| Aveia        | 9/80                 | 1 - 10        | 8/50                  | 100-200        | 4/50                 | 10-40        |
| Trigo        | 5/74                 | 1 - 10        | 3/29                  | 100-300        | 2/29                 | 10           |
| Silagem      | 2/13                 | 6 - 10        | 0/13                  | -              | 0/13                 | -            |
| Gluten       | 6/15                 | 1 - 15        | 2/15                  | 100            | 0/15                 | -            |
| <b>Total</b> | <b>63/513</b>        | <b>1 - 45</b> | <b>24/208</b>         | <b>100-500</b> | <b>19/208</b>        | <b>10-40</b> |

Legenda: (-) não detectado

Os registos obtidos em Portugal referentes à ocorrência de **aflatoxinas** em rações para animais apontam para um valor quase constante na frequência com que são detectadas (Quadro 3). Contudo, nos últimos anos têm-se registado bastantes casos positivos [6].

**Quadro 3** – Ocorrência de micotoxinas em rações para animais em Portugal na última década (1995-2005) [6],[7] e [8]

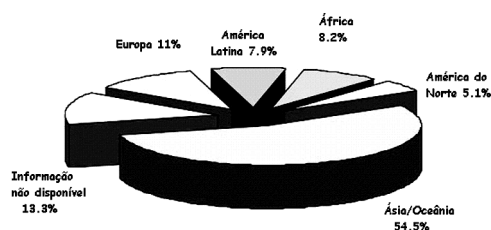
| Rações       | Aflatoxina B1   |             | Deoxinivalenol |                | Ocratoxina A  |            | Fumonisinias |          |
|--------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|---------------|------------|--------------|----------|
|              | n+/N            | µg/kg       | n+/N           | µg/kg          | n+/N          | µg/kg      | n+/N         | µg/kg    |
| Bovinos      | 374/1001        | 1-80        | nd             | -              | 0/50          | -          | nd           | -        |
| Suínos       | 27/261          | 1-20        | 5/261          | 100-500        | 1/50          | 2-4        | nd           | -        |
| Aves         | 35/161          | 1-21        | nd             | -              | 0/50          | -          | nd           | -        |
| Equinos      | 0/50            | -           | 15/50          | 100-320        | 30/50         | 2-5        | 0/50         | -        |
| <b>Total</b> | <b>436/1473</b> | <b>1-80</b> | <b>20/311</b>  | <b>100-500</b> | <b>31/200</b> | <b>2-5</b> | <b>0/50</b>  | <b>-</b> |

Legenda: (-) não detectado; nd: não determinado

Em rações para bovinos leiteiros são sistematicamente detectadas algumas amostras cujos níveis de contaminação são superiores a 5 µg/kg, correspondentes a valores superiores ao nível máximo admissível [9].

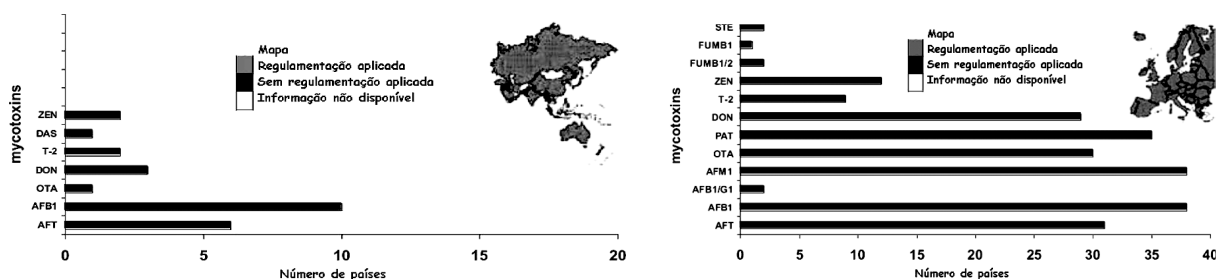
No que respeita à incidência dos **tricotecenos** existem poucos dados disponíveis em Portugal, embora sobre o DON sejam conhecidos alguns valores da sua incidência em matérias-primas e em rações para equinos (Quadro 2 e 3). As micotoxinas são substâncias tóxicas, algumas delas com elevado potencial cancerígeno e podem estar presentes numa vasta gama de alimentos.

Desta forma, a Comissão da União Europeia, com base na Recomendação[9] estabelece teores orientativos para os diferentes produtos destinados à alimentação animal. Na Figura 1 pode-se observar a percentagem da população mundial sob regulamentação a nível das micotoxinas.



**Figura 1-** Percentagem da população a nível mundial sob regulamentos de micotoxinas em 2003 (FAO, 2006).

Na Europa, para 39 países sabe-se que desde 2003 implementaram regulamentação específica para as micotoxinas [10]. A Figura 2 demonstra a ocorrência de limites regulamentares para diferentes micotoxinas na Europa em alimentos e rações respectivamente.



**Figura 2 -** Regulamentação das micotoxinas em alimentos e rações, na Europa (FAO, 2006).

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo revela que são frequentes as contaminações com micotoxinas de matérias-primas e alimentos compostos para animais em Portugal. A contaminação simultânea das

rações por micotoxinas pode constituir um potencial risco para a saúde animal e humana. Assim, o controlo e monitorização de micotoxinas nos alimentos compostos para animais e nas matérias-primas são procedimentos que devem ter um carácter sistemático. É necessário também aprofundar o conhecimento das espécies de fungos responsáveis pelo aparecimento de micotoxinas e as condições ecológicas onde proliferam, para se desenvolverem modelos de avaliação de riscos, concebendo desta forma ferramentas úteis para a criação de estratégias de prevenção.

### **Referências bibliográficas**

- [1] Krogh, P., 1987, “*Micotoxins in Food*”, Ed. Palle Krogh, Ed. Academic Press, UK, p. 1-96
- [2] Bernardo, F. M. A., 2003, “Micotoxicoses- Gestão de Risco (Lição de Síntese)”, Prova de Agregação, FMV Lisboa, p. 72
- [3] Betina, V., 1989, “*Mycotoxins – Chemical , Biological and Environmental Aspects*” Vol. 9, Ed. Elsevier USA, p. 11-169
- [4] Dutton, M. F., 1988, “Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis, *Microbiological Reviews*”, Vol. 52, No. 2, p. 274-295
- [5] Martins, M. L., Martins, H. M., 2001, “Mycoflora and mycotoxins incidence in raw materials (1996/2000)”, Livro de Congresso Micro, p.160
- [6] Martins, H. M., 2003, “Occurrence of aflatoxins in raw material and in feedstuffs in Portugal (2000-2002)”, Proceeding Book of The Congress of Food Protection, 2003- Costa da Caparica, Portugal
- [7] Guerra, M. M., Martins, H. M., Gouveia, M. F., Bernardo, F., 2005, “Aspectos da Segurança Sanitária dos alimentos compostos para cavalos”, *Revista Portuguesa de Zootecnia*, p. 63-75.
- [8] Martins, H. M., Guerra, M. M., Bernardo, F., 2006, “Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow’s feed over 10 years in Portugal (1995-2004)”, *Rev. Ibero-Americana*, Inpress
- [9] Recomendação da Comissão Nº 576 de 17 Agosto de 2006, J. Oficial da União Europeia, L. 229/7 - 229/9
- [10] Food and Agriculture Organization of United Nations, 2006 [www.fao.org](http://www.fao.org)

# PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS PELAS LEVEDURAS DO GÉNERO *Dekkera bruxellensis* EM VINHOS TOURIGA NACIONAL (DOC DÃO) DURANTE UM PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE 2 MESES

Rebelo, C.S.; Rodrigues da Silva, L.\*

Escola Superior Agrária de Viseu, Departamento das Indústrias Agro-Alimentares, Viseu, Portugal.

\*Tel +351-232 446 600 Fax 232 426 536 e-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** vinho tinto Touriga Nacional, fenóis voláteis, *Dekkera bruxellensis*.

**Resumo:** Este trabalho teve como objectivo determinar a influência dos teores das leveduras *Dekkera bruxellensis* em vinhos tintos Touriga Nacional, inoculados com esta levedura a uma temperatura de 25°C durante 2 meses, tendo-se verificado um incremento nas amostras inoculadas ao longo do período de incubação.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos têm um papel importante na qualidade do vinho, contribuindo para as características sensoriais, tais como: amargor, adstringência, sabor, odor e cor, além disso apresentam efeitos benéficos para a saúde humana relacionados com as suas propriedades antioxidantes e eliminação de radicais livres.

No vinho existem microrganismos (*Dekkera bruxellensis*) capazes de metabolizar os ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico) como precursores de fenóis voláteis, produzindo maioritariamente etilfenóis (4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol) e vinilfenóis (4-vinil-fenol e 4-vinil-guaiacol).

Os atributos organolépticos destes compostos têm sido caracterizados em diversas referências bibliográficas, designadamente pelo facto de os vinhos apresentarem odores/sabores indesejáveis para o consumidor.

Nos vinhos tintos, o 4-etil-fenol está na origem do cheiro a suor de cavalo e estábulo. Este quando presente em baixas concentrações, o seu cheiro poderá ser confundido com certas nuances aromáticas naturais dos vinhos tintos, o que justifica que se considere a presença desta molécula como um factor positivo, favorável à evolução de determinado carácter organoléptico dos vinhos, especialmente se estiver em quantidades inferiores ao limite de detecção (440 µg/l) (Gonçalves, 1996).

Os vinilfenóis estão presentes em maior quantidade nos vinhos brancos e os etilfenóis nos vinhos tintos. O 4-etil-guaiacol é mais facilmente detectado no aroma de um vinho, relativamente ao 4-etil-fenol, apresentando um limite de percepção bastante inferior. Para que a sua presença seja notável, o 4-etil-fenol tem que ter uma concentração cerca de nove vezes superior à do 4-etil-guaiacol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo utilizou-se vinho tinto Touriga Nacional da região do Dão, o qual foi submetido a uma filtração esterilizante (0,22 µm), sendo posteriormente distribuído por 7 amostras de 5 litros, das quais 6 foram inoculadas com estirpes de *Dekkera bruxellensis* (L69, L71, L73, L74, L75, L78), e uma amostra sem inoculação (T – Testemunha). Estas amostras foram incubadas a 25 °C durante dois meses, sendo recolhidas amostras para análise em períodos intervalados de 15 dias (quadro 1).

Os fenóis voláteis (4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol) foram quantificados por cromatografia gasosa (GC-FID), Mediram-se 100 cm<sup>3</sup> da amostra de vinho para um copo de precipitação e ajustou-se o pH a 8,0, com o auxílio de duas soluções de NaOH (12 e 1 M).

Para um balão volumétrico de 100 cm<sup>3</sup> de capacidade, mediram-se 50 cm<sup>3</sup> de amostra com uma pipeta volumétrica, 0,5 cm<sup>3</sup> de 3,4-dimetil-fenol e 4 cm<sup>3</sup> da mistura de éter-hexano. Homogeneizou-se a amostra durante 5 min. em agitador magnético e após decorridos os 5 min., colocou-se uma ampola de decantação e esperou-se até que ocorre-se uma separação nítida das duas fases. De seguida, recolheu-se a fase aquosa para o balão volumétrico e a fase orgânica para um frasco pequeno com tampa de silicone. Repetiu-se o método mais duas vezes para extracção da fase orgânica utilizando-se 2cm<sup>3</sup> de éter-hexano em cada extracção.

Devido à formação de emulsões no decorrer da técnica, é necessário levar a fase orgânica durante alguns instantes a agitar em agitador magnético para total clarificação.

Por fim colocou-se a fase orgânica em pequenas células (duas) devidamente identificadas, e guardaram-se a -4°C onde permaneceram até ao momento da injeção cromatográfica.

Os compostos, 4-etil-fenol, 4-etil-guaiacol e 3,4-dimetil-fenol (padrão interno), identificaram-se os compostos tendo como base os tempos de retenção relativos dos respectivos compostos puros.

**Quadro 4** – Microrganismos utilizados neste estudo.

| Amostra | Microrganismos                                  |
|---------|---|
| T       | Testemunha a 18°C                               |
| L69     | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L71     | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L73     | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L74     | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |
| L75     | <i>Dekkera bruxellensis</i> CBS 74 <sup>T</sup> |
| L78     | <i>Dekkera bruxellensis</i>                     |

### 3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 2.

| Composto        | Amostra             | Evolução dos Fenóis Voláteis (µg/l) |             |             |             |              |
|-----------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|                 |                     | 15*                                 | 30          | 45          | 60          | 75           |
| 4-etil-fenol    | T                   | 69,7 (0,1)                          | 70,1 (1,3)  | 70,5 (0,3)  | 70,9 (1,4)  | 71,0 (1,2)   |
| 4-etil-guaiacol |                     | nq                                  | nq          | nq          | nq          | nq           |
| 4-etil-fenol    | L69                 | 75,5 (1,1)                          | 93,7 (0,7)  | 123,1 (1,6) | 134,9 (0,3) | 180,1 (1,7)  |
| 4-etil-guaiacol |                     | nq                                  | nq          | nq          | nq          | nq           |
| 4-etil-fenol    | L71                 | 79,2 (0,8)                          | 100,7 (1,1) | 126,3 (1,5) | 139,7 (2,3) | 229,00 (1,2) |
| 4-etil-guaiacol |                     | 18,2 (1,1)                          | 29,4 (0,4)  | nq          | nq          | 38,3 (1,9)   |
| 4-etil-fenol    | L73                 | 86,1 (1,5)                          | 97,3 (1,4)  | 111,8 (1,2) | 126,8       | 148,7 (0,9)  |
| 4-etil-guaiacol |                     | 16,00 (0,4)                         | nq          | 28,60 (1,0) | nq          | nq           |
| 4-etil-fenol    | L74                 | 79,4 (0,5)                          | 95,7 (0,6)  | 124,7 (1,4) | 145,4 (0,4) | 175,1 (1,3)  |
| 4-etil-guaiacol |                     | nq                                  | nq          | nq          | nq          | 17,4 (2,1)   |
| 4-etil-fenol    | CBS 74 <sup>T</sup> | 90,2 (0,3)                          | 94,1 (1,1)  | 99,4 (0,7)  | 112,6 (2,0) | 129,0 (1,8)  |
| 4-etil-guaiacol |                     | nq                                  | 19,10 (0,5) | 29,20 (0,9) | nq          | nq           |
| 4-etil-fenol    | L78                 | 75,3 (0,7)                          | 91,2 (0,9)  | 97,4 (1,4)  | 171,5 (2,1) | 193,0 (1,3)  |
| 4-etil-guaiacol |                     | nq                                  | nq          | nq          | nq          | nq           |

\* Recolhas efectuadas quinzenalmente

**Tabela 2** – Teores de 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol obtidos nas amostras ao longo do tempo.

Dos resultados obtidos podemos concluir que existe um acréscimo nos teores de 4-etil-fenol, no entanto estes aumentos não foram tão significativos como em outros trabalhos publicados em que se utilizaram amostras inoculadas com *Dekkera bruxellensis*.

### REFERÊNCIAS

- Gonçalves, M.C. (1996). Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*. Mestrado em viticultura e Enologia. Lisboa
- Valentão, P.; Seabra, R. M.; Lopes, G.; Silva, L. R.; Martins, V.; Trujillo, M. E.; Velázquez, E.; Andrade, P. B. (2006). Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*. 100 (2007): 64-70.
- Silva, L. R.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Trujillo, M. E.; Velázquez, E. (2005). Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeasts. *Food Chemistry*, **89**: 185-189.





# RESÍDUOS DE COCCIDIOSTÁTICOS EM GÉNEROS ALIMENTÍCIOS DE ORIGEM ANIMAL

Nunes da Costa, J.M.\*<sup>(1)</sup>, Fradinho, M.J.<sup>(1)</sup> Pinto, M.<sup>(2)</sup>, Ferreira, E.<sup>(2)</sup> & Mariano, G.<sup>(2)</sup>

Direcção Geral de Veterinária

<sup>(1)</sup> Direcção de Serviços de Meios de Defesa da Saúde, Bem Estar e Alimentação Animal

<sup>(2)</sup> Direcção de Serviços de Higiene Pública Veterinária

Largo da Academia Nacional das Belas Artes, N.º 2, 1249-105 Lisboa Portugal

Tel: 213239500 ; Fax: 213239501 ; e-mail: [veterinaria@mail.telepac.pt](mailto:veterinaria@mail.telepac.pt)

\* endereço para correspondência: [josecosta@dgv.min-agricultura.pt](mailto:josecosta@dgv.min-agricultura.pt)

**Palavras-Chave:** coccidiostáticos; resíduos; géneros alimentícios; PNCR; alimentos para animais

**Resumo:** O uso em alimentação animal de aditivos do grupo funcional dos coccidiostáticos tem como objectivo a protecção da saúde animal, mediante um efeito profilático para impedir a colonização por protozoários do género *Eimeria sp.*, na sequência de uma administração diária e continuada em teores reduzidos. As condições de utilização aprovadas ao abrigo da Dir. 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro, e previstas em regulamentos comunitários próprios, para além das espécies/categorias animais de destino, prevêm ainda os teores mínimos e máximos de incorporação nos alimentos compostos, as idades máximas para a sua administração e outras disposições relativas à sua utilização, onde é indicado, caso se aplique, o intervalo de segurança a obedecer antes do abate dos animais. Evita-se assim o aparecimento de resíduos das substâncias activas autorizadas nos produtos de origem animal, ou dos seus metabolitos, garantindo o nível de protecção necessário para a segurança dos consumidores.

A recente detecção de níveis de resíduos de diclazuril e de nicarbazina em músculo de frango e ovos, superiores aos limites de detecção dos método de análise por técnica de LC-MS/MS executados no âmbito do Plano Nacional de Controlo de Resíduos, poderão ser indicadores de más práticas de fabrico ou inadequadas implementações dos requisitos de higiene obrigatórios a todos os industriais de alimentos compostos, bem como de utilizações indevidas de alimentos, a nível das explorações pecuárias.

Em qualquer dos casos, torna-se necessária uma avaliação de risco, de forma a permitir a identificação das causas, tomar as medidas correctivas adequadas e assegurar a consequente salvaguarda da saúde pública.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso em alimentação animal de aditivos do grupo funcional dos coccidiostáticos tem como objectivo a protecção da saúde animal, mediante um efeito profilático para impedir a colonização por protozoários do género *Eimeria sp.*, na sequência de uma administração diária e continuada em teores reduzidos. As condições de utilização aprovadas ao abrigo da Dir. 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro, e previstas em regulamentos comunitários próprios, para além das espécies/categorias animais de destino, prevêm ainda os teores mínimos e máximos de incorporação nos alimentos compostos, as idades máximas para a sua administração e outras disposições relativas à sua utilização, onde é indicado, caso se aplique, o intervalo de segurança a obedecer antes do abate dos animais. Evita-se assim o aparecimento de resíduos das substâncias activas autorizadas nos produtos de origem animal, ou dos seus metabolitos, garantindo o nível de protecção necessário para a segurança dos consumidores.

O presente trabalho tem como principal objectivo a apresentação dos resultados obtidos durante a execução do plano de vigilância - Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) - para a pesquisa de resíduos de coccidiostáticos em géneros alimentícios de origem animal, bem como das medidas preventivas e/ou correctivas adequadas a aplicar em caso de incumprimento da legislação em vigor.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A Direcção Geral de Veterinária (DGV) tem nas suas competências a implementação do Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), cumprindo o estipulado no Decreto-Lei n.º 148/99 de 4 de Maio e no Decreto-Lei N.º 185/2005 de 4 de Novembro.

Este Plano consiste basicamente num sistema de vigilância que visa analisar e pôr em evidência a eventual presença de resíduos de risco nos géneros alimentícios de origem animal, esclarecer as razões dessa presença e responsabilizar todos os intervenientes da cadeia da produção de animais e de produtos de origem animal, pela qualidade e segurança dos produtos alimentares de origem animal destinados ao consumo humano. A execução do PNCR baseia-se na colheita de amostras para pesquisa de resíduos de substâncias não autorizadas, resíduos de medicamentos veterinários que excedam os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos e ainda o controlo de contaminantes ambientais de acordo com o Regulamento (CEE) N.º 2377/90 do Conselho de 26 de Junho, o Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março e demais legislação aplicável.

As amostras foram colhidas pelas brigadas da DGV a nível dos matadouros, centros de classificação de ovos, centros de recolha de leite, apiários, aquiculturas, caçadas e centros de recolha de caça.

As determinações analíticas foram executadas pelo Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), que está indigitado como Laboratório Nacional de Referência (NRL) para a pesquisa de resíduos nos animais e nos produtos de origem animal. Os métodos de análise utilizados baseiam-se em técnica de LC-MS/MS.

## 3. RESULTADOS

Durante o ano de 2006 foram colhidas 243 amostras para pesquisa de resíduos de coccidiostáticos de acordo com o apresentado na Figura 1.

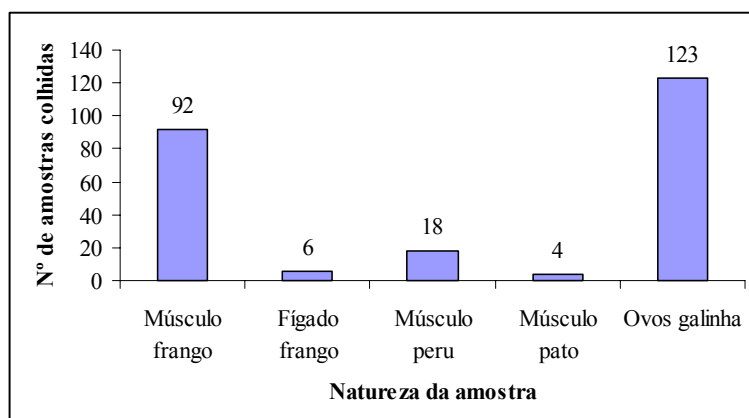


Figura 1. Numero de amostras colhidas em aves para pesquisa de coccidiostáticos no âmbito do PNCR-2006

Na Figura 2 são apresentados o número de resultados não conformes obtidos nas amostras analisadas, de acordo com a sua natureza e tipo de resíduo detectado.

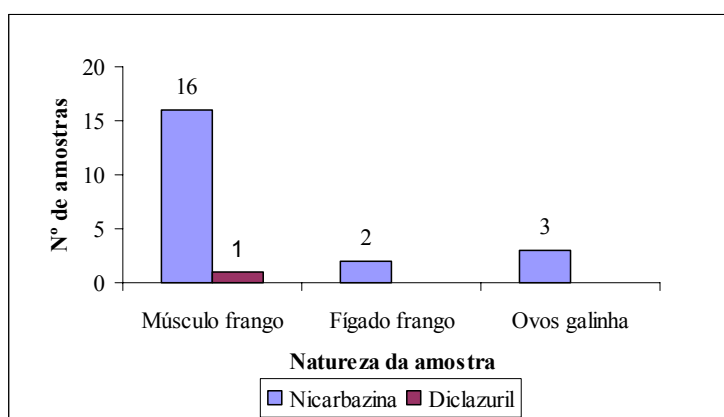


Figura 2. Número de resultados não conformes

Os resultados referentes à quantificação dos resíduos detectados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Intervalo de valores referentes aos resíduos de nicarbazine e diclazuril quantificados por tipo de amostra analisada

|                     | Músculo frango | Fígado frango | Músculo peru | Músculo pato | Ovos galinha |
|---------------------|----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Nicarbazine (µg/kg) | 2,0 - 90,0     | 24,4 - 69,0   | -            | -            | 2,0 - 16,0   |
| Diclazuril (µg/kg)  | 11,4           | -             | -            | -            | -            |

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A nicarbazine está autorizada ao abrigo da Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro, como aditivo destinado à alimentação animal do grupo funcional dos coccidiostáticos e outras substâncias medicamentosas, em conjunto com a substância narasina. A mistura em partes iguais de ambos os princípios activos, na proporção 8,0%, é comercializada sob a designação de Maxiban G160. cujas condições de utilização previstas pelo Regulamento (CE) N.º2430/1999 da Comissão de 18 de Novembro fixam em 80 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente, os teores mínimos e máximos de incorporação em alimentos compostos para frangos de engorda e proíbem a sua administração nos cinco dias prévios ao abate.

O diclazuril está também autorizado ao abrigo da mesma Directiva como coccidiostático com a designação comercial de Clinacox, prevendo-se a sua utilização em frangos de engorda, perus de engorda e frangas para postura num teor único de incorporação de 1 mg/kg de alimento composto. À semelhança da nicarbazine, a sua administração está igualmente proibida num período mínimo de cinco dias antes do abate.

A fixação de um intervalo de segurança permite assegurar a ausência, ou detecção abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), de resíduos das substâncias farmacologicamente activas, ou dos seus metabolitos, nos tecidos edíveis das espécies/categorias animais visadas. Até ao momento não estão estabelecidos LMR a nível comunitário para nicarbazina e diclazuril, o que implica que todos os valores superiores ao limite de quantificação dos métodos de análise utilizados, devam ser considerados. Contudo, a detecção de resíduos de nicarbazina e diclazuril em amostras biológicas de frango e em ovos, poderá ser indicadora de más práticas de fabrico ou inadequada implementação dos requisitos de higiene obrigatórios a todos os industriais de alimentos compostos, bem como de utilizações indevidas de alimentos a nível das explorações pecuárias.

O controlo oficial no âmbito da alimentação animal, quer a nível de fabricantes ou das próprias explorações pecuárias, bem como a sua integração com o PNCR, poderão ser decisivos na prevenção das situações referidas.

Em qualquer dos casos, torna-se necessária uma avaliação do risco, de forma a permitir a identificação das causas, tomar as medidas correctivas adequadas e assegurar a consequente salvaguarda da saúde pública.

#### **Referências:**

1. Decreto-Lei n.º 148/99, de 4 de Maio, que estabelece as medidas de controlo relativas às substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas e medicamentos veterinários e contaminantes
2. Decreto-Lei N.º 185/2005 de 4 de Novembro, que proíbe a utilização de certas substâncias com efeito hormonal ou tireostático e substâncias beta-agonistas em produção animal
3. “Normativo para colheitas de amostras para o Plano Nacional de Controlo de Resíduos”, DGV/2005
4. Regulamento (CEE) N.º 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho, que prevê o processo comunitário para o estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal.
5. Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão, de 8 de Março, que fixa os teores máximos em certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios
6. Regulamento (CE) N.º 2430/1999 da Comissão, de 18 de Novembro, que vincula a autorização de determinados aditivos do grupo dos coccidiostáticos e outras substâncias medicamentosas nos alimentos para animais aos responsáveis pela colocação desses aditivos em circulação
7. Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro, relativa aos aditivos na alimentação para animais
8. D.L. N.º 247/2002, de 8 de Novembro, que estabelece os princípios relativos à organização dos controlos oficiais no domínio da alimentação animal

# SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SORBIC AND BENZOIC ACIDS IN YOGHURT BY CE AND HPLC: METHOD COMPARISON AND VALIDATION

*Duthoit<sup>1</sup>, M.; Vital<sup>1</sup>, A.; Ravasco<sup>1</sup>, F. and Roseiro<sup>2\*</sup>, L.B.*

INETI – Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Estrada do Paço do Lumiar, 22  
Lisboa, Portugal - <sup>1</sup>DTIA - Unidade de Indústrias Lácteas e <sup>2\*</sup>Departamento de Biotecnologia  
Tel. +351 210924600 ext. 4279 Fax +351 217163636 email: luísa.roseiro@ineti.pt

**Keywords:** food preservatives, yoghurt, capillary electrophoresis, HPLC, method validation

**Summary:** Benzoic and sorbic acids and their respective salts (sodium, potassium and calcium salts) have been widely used as food preservatives, usually to inhibit yeast and mould growth, being also effective against a wide range of bacteria. Whilst benzoic acid occurs naturally in many foodstuffs, namely fruits and vegetables but also in milk and dairy products at low concentration, it is available commercially by chemical synthesis. These chemical preservatives are most active in foodstuffs of low pH value, being yoghurt an example of such. Despite the widespread of their use, some studies have reported the development of allergenic reactions to benzoates in humans. Sorbic acid, however, seems to have very low toxicity. There are several methods for the analysis of benzoates and sorbates in food and beverage, being HPLC the most common for their detection and quantification. Recently, capillary electrophoresis (CE) has been applied to the analysis of a wide range of food-related substances. The aim of the present work was to compare and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) and a capillary zone electrophoresis (CZE) method with DAD for the simultaneous detection and quantification of benzoic and sorbic acids in yoghurt. The suitability of both methods for quantitative determination of benzoic and sorbic acids was proved through validation specifications such as selectivity, linearity and limits of detection and quantification. The HPLC and CE assays were compared by analysing yoghurt samples from the producer using the two methods, obtaining statistically similar quantitative results.

## 1. INTRODUCTION

Food preservation has always been of great importance and nowadays this preservation is often made with the use of chemical preservatives, among which benzoic (E210) and sorbic (E200) acids, and their respective sodium, potassium and calcium salts (respectively E211, E212, E213 and E201, E202 and E203) are widely used. They are generally used to inhibit yeast and mould growth, being also effective against a wide range of bacteria involved in food poisoning and food spoilage such as *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp (Sieber et al., 1995). These compounds are most active in foods of low pH value, as is the case of yoghurt.

The salts of benzoic acid are produced by the reaction between the acid and an appropriate hydroxide. Commercially, sodium benzoate is the most commonly used of the three benzoic acid salts. Occasionally, potassium benzoate is used where lower sodium content is required. In contrast to its acidic precursor, sodium benzoate is a white crystalline powder with an alkaline pH and is water-soluble as well as soluble in alcohol, ether, chloroform and fixed oils, making it the preferred form for use in food products. When ingested, benzoic acid and sodium benzoate are rapidly absorbed from the digestive tract. On reaching the liver they combine with the amino acid glycine and are excreted in the urine. As long as liver function is healthy and adequate glycine is available, both chemicals are completely eliminated from the body (75-100% of the dose is excreted within 6 hours and the remaining portion within 2-3

days). Sorbic acid is also rapidly metabolized by pathways similar to those of other fatty acids.

Benzoates (particularly benzoic acid) occur naturally in foods at varying levels. They may be present in the form of free acid, simple salt, esters and amides. Benzoates are also substances that are natural to the body's metabolism, and para-aminobenzoic acid (PABA) is produced by the intestinal flora. PABA plays a role in the breakdown and use of proteins and in the formation of red blood cells. It stimulates folic acid production and helps maintain healthy skin and hair.

Single foods which are considered to contain high levels of benzoic acid include most berries, (especially strawberries, raspberries and cranberries); apples, prunes, apricots, greengage plums; Ceylon tea; spices such as cinnamon, nutmeg, clove and anise; cherry bark (used in natural cherry flavour beverages and ice creams); cassia bark (used as a natural flavouring of cola, and as a spice flavouring in ice cream, baked goods, and beverages); cocoa; mushrooms; honey and yoghurt.

In yoghurt, benzoic acid is produced by lactic acid bacteria during fermentation from hippuric acid, a naturally present component of milk at concentrations that can reach up to 50mg/kg (Sieber et al, 1995). Combinations of natural benzoate-containing foods may also contribute to a higher than expected level of natural benzoates, e.g., in fruits yoghurt. Values detected in foodstuffs may be "country-specific," and particularly in fruits and vegetables may be influenced by growing conditions and seasons. In fermented and cultured foods, there is uncertainty whether all culture strains or only a specific species is responsible for producing benzoic acid.

Despite the widespread use of these antimicrobial agents, the development of allergic reactions to benzoates in humans, such as urticaria and asthma and when combined with tartrazine (E102), provokes a very high hyperactive response in children. A few cases of intolerance to sorbic acid have also been reported. The use of food additives in different countries is limited by specific regulations. According to the Food Standards Agency, the acceptable daily intakes (ADI) for these preservatives are 5 mg/kg body weight for benzoic acid and its salts and 25 mg/kg body weight for sorbic acid and its salts. These represent the amount of the substances that can be daily consumed without health hazards. For all the foodstuffs Portugal, like the other European countries, follow the Directive 95/2/CE which recommends specifically for yoghurt the maximum value of 300 mg/kg for the combination of benzoic acid and sorbic acid and their respective salts.

There are several methods for the analysis of benzoates and sorbates in food and beverage, (TLC, UV spectroscopy, GC, etc) being HPLC the most common for their detection and quantification. Recently, capillary electrophoresis (CE) has been applied to the analysis of a wide range of food-related substances, such as preservatives. In the present work, a high-performance liquid chromatography (HPLC) and a capillary electrophoresis (CZE) method with DAD were compared and validated for the simultaneous detection and quantification of benzoic and sorbic acids in yoghurt samples obtained from the producer.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Standards and chemicals**

All reagents used for both HPLC and CE methods were analytical grade purchased from Merck. Standards of benzoic and sorbic acids were obtained from Sigma Chemical. Water used for standards and solutions preparation was obtained from a Millipore Milli-Q water

purification system. All HPLC and CE solutions as well as samples prior to injection were filtrate using 0.45 µm filter from Millipore.

## 2.2 Standards and samples preparation

Standards of benzoic and sorbic acids were prepared from stock solutions of 25 mg standard in 50 ml methanol. Dilutions from the stock solutions in methanol:water (50:50 v/v) were prepared for both standards in order to get a standard range of 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0 and 50.0 µg/ml.

Eleven samples of yoghurt coded A to K containing fruits, cereals or both, from different brands were obtained from the producer. Each sample was prepared according to the method described in the International Standard IDF 139:1987. In short, 20 g of yoghurt sample were made alkaline using NaOH aqueous solution followed by precipitation of fat and protein using specific precipitation solutions. The mixture was filtered and the clarified solution was used for both HPLC and CE.

## 2.3 Apparatus and conditions

HPLC separation was done according to the method described in the International Standard IDF 139:1987 with slight modifications. The analysis was carried out using a Waters HPLC apparatus equipped with a Waters 510 pump, in-line degasser, a Waters 717 plus Autosampler and a Waters 2487 DAD. Data collection and analysis was performed using Waters software Empower. The column used was a µBondapak™ C18 125 Å 10µm (3.9x300 mm). Mobile phase was an isocratic methanol: phosphate buffer (8:92 v/v) at room temperature and a flow rate of 1.0 ml/min. 10 µl of sample extracts and standard solutions were injected.

For CE analysis, a 3D CE apparatus from Agilent with DAD including the ChemStation software for data analysis was used. Method used was a modified method described by Roseiro et al. 2005 (1). A 20 mM sodium tetraborate decahydrate in 20% methanol adjusted to pH 9.3 was used as separation buffer. The conditions for CE analysis were as follows:

| VARIABLE    | SETTINGS   | VARIABLE         | SETTINGS   |
|-------------|--|------------------|--|
| capillary   | Agilent extended light path capillary (L= 56 cm, i.d. 50 µm) | migration time   | 30 min   |
| temperature | 25°C   | voltage          | 25 kV with a 0.5 min ramp up   |
| offset      | 8 mm   | wavelength       | 200 nm   |
| injection   | 50 mBar x 15 s at the anode(+)                               | spectra          | All in peak 190-600 nm   |
| current     | 120 µA max setting   | Pre-conditioning | 3 min 0.1 M NaOH flush followed by 3 min run buffer from the home vial |

## 2.4 Validation

Validation was done following the methodology described by Castro (2000). Quantification procedures for both techniques and concentration of benzoic and sorbic acids were done by plotting peak area (corrected peak area in the case of CE) versus standards concentrations (µm/ml). Calibration curves were carried out for each benzoic and sorbic acid standard at the

concentrations referred for the standard range (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0 and 50.0 µg/ml). Each concentration was prepared in triplicate.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Validation results and application to the determination of benzoic and sorbic acids in yoghurt samples

Assay validation results obtained from within-run and between-run experiments for benzoic and sorbic acids analysed by HPLC and CE are summarised in Table 1

Both methods were applied to the determination of benzoic and sorbic acids in yoghurt samples (11 samples) obtained from producers. For both methods the concentration of benzoic and sorbic acids in the yoghurt samples were determined by interpolation on the linear regression line. Only samples C, D and F presented benzoic acid expressed as benzoate at values under 20 mg/kg.

The results for sorbic acid expressed as potassium sorbate are presented in Table 2. Results for the quantification of the referred preservatives in yoghurt are well below the limit recommended (300 mg/kg). Also qualitatively, results are according to the samples label specifications (benzoate detected in samples B, C and F are most likely original in yoghurt from the fermentation process). The results obtained by HPLC and CE are not statistically different at a 95% confidence level (data not shown calculated by a Student's *t*-test). Calibration curves were linear for benzoic and sorbic acids at least to the range 0.5-50 µg/ml (0.9999) and 2.5-50 µg/ml (0.9999) for HPLC and CE, respectively (data not shown). Both methods exhibited satisfying validation results concerning linear range and detection and quantification limits and allowed direct and sensitive quantification of both preservatives in yoghurt samples. The separation efficiency is higher in HPLC, but shorter separation times could also be obtained in CE if running buffer is prepared in water instead of 20% MeOH (migration times of 6.5 and 7 min, respectively, for sorbic and benzoic acids). However, the CE method used also allows the simultaneous detection of ascorbic acid and artificial sweeteners without interferences, which could be an advantage over the HPLC method. Also, the consumption of sample and solvent volumes is enormously different, that is, more than 100-fold less for CE. The cost of a capillary and electrolyte required for a specific number of analyses are evidently lower than in HPLC.

CE method for the determination of preservatives in food is then an interesting alternative to HPLC methods. Both methods can be very suitable for cross-validation studies.

Table 1- Summary of validation data for benzoic and sorbic acids obtained by HPLC and CE

| VALIDATION PARAMETERS        | BENZOIC ACID |        | SORBIC ACID |        |
|------------------------------|--------------|--------|-------------|--------|
|                              | HPLC         | CE     | HPLC        | CE     |
| Linearity range (µg/ml)      | 0.5-50       | 2.5-50 | 0.5-50      | 2.5-50 |
| Slope                        | 39226        | 433.7  | 132552      | 337.5  |
| Intercept                    | 1401.3       | 732.5  | 2193.9      | 372.5  |
| Correlation coefficient      | 0.9999       | 0.999  | 0.9999      | 0.9981 |
| Standard error               | 2036         | 303    | 7905        | 328    |
| n                            | 6            | 6      | 6           | 6      |
| Detection limit (µg/ml)      | 0.2          | 2.3    | 0.2         | 2.6    |
| Quantification limit (µg/ml) | 0.5          | 7.0    | 0.6         | 7.9    |
| Separation time              | 6.8          | 18.6   | 9.5         | 15.9   |



Table 2- Concentrations of sorbic acid expressed as potassium sorbate found in yoghurt samples by HPLC and CE

| Sample   |  | Results (mg/kg) |     | Package label             |
|----------|--|-----------------|-----|---------------------------|
| Code     | Description  | HPLC            | CE  |                           |
| <b>A</b> | Low-fat fruit and cereal liquid strawberry yoghurt | 59              | 64  | Fruit preservative (E202) |
| <b>B</b> | Fruit and cereal liquid apple/orange/peach yoghurt | 160             | 177 | Fruit preservative (E202) |
| <b>C</b> | Biscuit yoghurt                                    | 169             | 187 | Preservative (E202)       |
| <b>D</b> | Sweetened stirred strawberry pieces yoghurt        | 163             | 214 | Fruit preservative (E202) |
| <b>E</b> | Cereal stirred yoghurt                             | 192             | 200 | Fruit preservative (E202) |
| <b>F</b> | Stirred banana/orange/biscuit yoghurt              | 160             | 158 | Preservative (E202)       |
| <b>G</b> | Creamy Stirred apple/gila/cinammom yoghurt         | 132             | 136 | Fruit preservative (E202) |
| <b>H</b> | Creamy Stirred lemon yoghurt                       | 95              | 86  | Fruit preservative (E202) |
| <b>I</b> | liquid phytosterols strawberry yoghurt             | 61              | 64  | Fruit preservative (E202) |
| <b>J</b> | Set natural yoghurt                                | 126             | 140 | -                         |
| <b>K</b> | Set strawberry yoghurt                             | -               | 39  | Preservative (E202)       |

**Literature Cited:**

- Castro, A. F. R. 2000. Guia RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. RELACRE, Lisboa.
- International IDF Standard 139:1987. Milk, dried milk , yogurt and other fermented milks.. Determination of benzoic and sorbic acid content
- Roseiro, L. B. et al. (2005). International Dairy Journal, 15, pp. 579-584.
- Sieber, R. (1995). Benzoic acid as natural compound in cultured dairy products and cheese. International Dairy Journal, vol.5, n. 3, pp. 227-246.

## STABILITY OF CAROTENOIDS IN A MIXTURE OF ORGANIC SOLVENTS

*Dias\**, M.G. and Oliveira, L.

Laboratório de Bromatologia e Nutrição, Centro de Segurança Alimentar e Nutrição (CSAN)  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - INSA  
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa – Portugal (<http://www.insarj.pt>)  
\*[m.graca.dias@insa.min-saude.pt](mailto:m.graca.dias@insa.min-saude.pt)

All carotenoids may be derived from the acyclic C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> structure having a long central chain of conjugated double bonds (IUPAC, 1974). Such structure imparts them sensitivity to, light, temperature, oxygen and active surfaces. During storage, problems of degradation, structural rearrangement, stereoisomers formation and other physico-chemical reactions can occur and so stability questions should be addressed.

These natural pigments are present in fruits and vegetables. There are many studies showing strong correlations between carotenoids intake both with the improvement of the immune system and with a reduced risk of some diseases, such as cancer, cardiovascular diseases and eye degeneration (Cooper, 2004; Krinsky and Johnson, 2005). In Europe the predominant carotenoids, both in serum and food, are  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene, lutein and zeaxanthin (Granado et al, 1996).

Carotenoids determination in foods by HPLC demands the use of expensive and some times not easily available standards (some standards can cost about 375 €/mg). Furthermore, to freshly prepare, each day of analysis, standard solutions for external calibration containing the six different analites above referred at a minimum of five concentration levels is also expensive and extremely time consuming.

The stability of working standard solutions at -80 °C was studied for 6 concentration levels equally distributed in a range of 0.1 µg/mL to 4.0 µg/mL . Solutions were prepared in HPLC mobile phase: acetonitrile:methanol (0.05 M ammonium acetate):dichloromethane, 75:20:5, v/v/v, containing 0.1% BHT and 0.05% triethylamine. Storage was done in glass flasks to avoid adsorption problems. Each day of analysis standard solutions were withdrawn from the freezing cabinet, immediately aliquoted into auto sampler vials and the remaining kept at -80°C as quickly as possible. Stability was monitored by daily duplicate injection of the above solutions, detection at 450 nm with a diode array detector. Daily results were compared statistically with the ones obtained in the first day, using analysis of variance.

The analysis of the results allows us to conclude that the studied working standard solutions are stable at – 80° C for at least 6 weeks, enabling to significantly save time and money.

*Part of this work and conference attendance is supported by EuroFIR Consortium funded under the EU 6<sup>th</sup> Framework Food Quality and Safety Programme; Project contract No: FOOD-CT-2005-513944.*

### Bibliography:

- Cooper, D.A., 2004. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J. Nutr.* 134(1): 221S-224S.
- IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry and the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1974). Nomenclature of Carotenoids. Retrieved on 2004-06-01: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac.carot/>
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., Rojas-Hidalgo, E., 1996. Major fruits and vegetables contributors to the main carotenoids in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50: 246-250.

# SUBSTÂNCIAS INDESEJÁVEIS EM FÍGADOS DE ESPÉCIES PECUÁRIAS

*Martins<sup>1</sup>, H.M. e Barbosa<sup>1</sup>, J.*

<sup>1</sup>Laboratório Nacional De Investigação Veterinária- Serviço de Micologia, Departamento de Higiene Pública, Estrada de Benfica,701, 1549-011- Lisboa, Portugal

E-mail:; [marina.martins@lniv.min-agricultura.pt](mailto:marina.martins@lniv.min-agricultura.pt); [jorge.barbosa@lniv.min-agricultura.pt](mailto:jorge.barbosa@lniv.min-agricultura.pt)

## Resumo

As aflatoxinas são metabolitos secundários produzidos por alguns bolores do género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*) que por vezes são detectadas nos alimentos compostos destinados às espécies de produção. Atendendo ao papel que o fígado dos animais desempenha na metabolização das aflatoxinas e considerando que este órgão destoxicador funciona como uma espécie de “reservatório” biológico destas toxinas fúngicas, o fígado de animais de produção tem sido usado em planos de vigilância de resíduos, como um alvo preferencial para detecção de aflatoxinas no organismo dos animais. No âmbito do “Plano Nacional de Controlo de Resíduos” (PNCR), foram colhidas diversas amostras de fígados de bovinos, suínos e aves em matadouros nacionais, e nas quais se pesquiram as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (AFBs). Para a detecção e quantificação foi utilizado um método de cromatografia em camada fina (TLC) (Gimeno e Martins, 1982), após deslipidificação com isoctano, confirmação com uma solução de ácido sulfúrico e água e reconfirmação pelo método de Przybylski (1975). O limite de detecção do método é 0,18µg/kg. Nos últimos cinco anos (2001-2005) foram analisados 1840 amostras, tendo-se revelado todas negativas à pesquisa das referidas aflatoxinas. Estes resultados sugerem que a monitorização de aflatoxinas deve ser preferencialmente dirigida para a detecção daquelas substâncias indesejáveis nas fontes alimentares, respectivas matérias-primas e alimentos complementares.

**Palavra chave:** aflatoxinas, fígado, espécies pecuárias.

## Referências

Gimeno, A. Martins, M. L. 1982. Multimycotoxin method for analysis of 17 mycotoxins in raw materials, mixed feed, food products and animal tissues by thin layer chromatography. V International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Vienna, Austria. In: Proceedings, pp-24-27.

Przybylski, W., 1975, Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **58**, 163-164

## TOTAL ANTI-OXIDANT DETERMINATION IN HUMAN MILK DURING THE FIRST FOUR MONTHS OF BREAST-FEEDING.

*Matos, C.<sup>1\*</sup>, Moutinho, C.G.<sup>1</sup>, Balcão, V.M.<sup>1</sup>, Almeida, C.V.<sup>1</sup>, Guerra, A.<sup>2</sup>, Rocha, G.<sup>2</sup>, Guimarães, H.<sup>2</sup>, Ribeiro, M.<sup>2</sup>, Marques, F.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Centro de Bioengenharia e FarmacoClínica, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Praça 9 de Abril nº 349, P-4249-004 Porto, Portugal; \*E-mail: [cmatos@ufp.pt](mailto:cmatos@ufp.pt)

<sup>2</sup>Serviço de Neonatologia, Departamento de Pediatria, Hospital de São João, Alameda Prof Hernâni Monteiro 4202-451 Porto, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, P-4250-542 Porto, Portugal.

Breast milk is the natural food for the newborn babies. Breast milk from healthy women contains all the nutrients necessary for newborn infants and also contains a variety of growth and immune factors, and many other components that protect the newborn. Amongst these, antioxidants can help prevent oxidative stress situations, offering a vital antioxidant protection of the newborn. The complete list of active antioxidant components in human milk is not known, but  $\alpha$ -tocopherol, cysteine, ascorbate or carotenoids have been found, as have antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase (1)

The research work presented herein seeks to prospectively study and follow the total antioxidant status (TAS) of mother's milk during the first four months after giving birth. Milk samples were collected from (31) lactating women recruited at the Service of Obstetrics of the Hospital de São João in Porto, on the basis of their willingness to enter the study and that filled several pre-requisites. Samples were collected during the post-partum period, after 7 days, 4, 8, 12 and 16 weeks of giving birth. On a particular day, milk samples were collected several times during that day, kept refrigerated and pooled together to produce a milk sample for analysis, representative of the average milk composition of that particular day. After pooling, samples were bubbled with gaseous nitrogen and frozen at -80 °C until analysis.

TAS was measured spectrophotometrically at 600 nm using a Randox commercial kit (catalogue no. NX 2332) (2).

The fact that this was a prospective study, allowed one to obtain the composition in fatty acids in transition milk, at 7 days, and in mature milk, from 4 to 16 weeks of lactation. The influence of the mother's diet upon the aforementioned antioxidant profile was also assessed.

### References

1. J. QUILES et al., 2006. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radical Research*, 40(2): 199–206
2. J. MAGALHÃES et al., 2005. Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *Eur J Appl Physiol* (2005) 93: 726–732

# VALIDAÇÃO INDIRECTA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> E DE DEOXINIVALENOL POR HPLC. APLICAÇÃO A ALIMENTOS BOVINOS LEITEIROS E MILHOS

*Ferreira<sup>1</sup>, S.; Marques<sup>1\*</sup>, M.; Martins<sup>1</sup>, H.M.; Esquível<sup>2</sup>, M.M. e Pinheiro<sup>2</sup>, H.*

<sup>1</sup>Lab. Nacional de Investigação Veterinária –Micologia- Estrada de Benfica, 701-1549-011, Lisboa;

<sup>2</sup>Instituto Superior Técnico-Dep. de Eng<sup>a</sup> Química e Biológica – Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

Telefone: 21 71153 36; Fax: 21 71153 84; E-mail: [marina.martins@lniv.min-agricultura.pt](mailto:marina.martins@lniv.min-agricultura.pt);  
[coimbra.mm@gmail.com](mailto:coimbra.mm@gmail.com)

Palavras-chave: validação, aflatoxina B<sub>1</sub>, deoxinivalenol, alimentos compostos, milho.

## 1. RESUMO

A presença de micotoxinas nos alimentos representa um grave problema de segurança sanitária. Os alimentos susceptíveis de estarem contaminados têm de ser objecto de controlos regulares. No presente estudo validaram-se os métodos de determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e deoxinivalenol (DON), por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), com purificação por colunas de imunoafinidade. Estabeleceu-se a gama de trabalho, recta de calibração e respectiva linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Os intervalos e concentrações padrão de AFB<sub>1</sub> e DON testados foram de 0,175 a 0,550 ng AFB<sub>1</sub>/ml e 100 a 800 ng DON/ml. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram, respectivamente, de 0,2 µg/kg e 0,4 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e 30 µg/kg e 91 µg/kg para DON. As percentagens de recuperação variaram entre 58,0 e 74,5%, no intervalo de concentrações de 0,4 a 2,0 µg AFB<sub>1</sub>/kg e 86,5 e 126,1%, no intervalo de 60 a 600 µg DON/kg. Efectuou-se a determinação em 30 amostras de alimentos compostos para animais bovinos leiteiros e em 16 amostras de milho, para AFB<sub>1</sub> e DON respectivamente. Das 30 amostras, 2 (6,7 %) revelaram-se positivas para AFB<sub>1</sub> sendo os valores detectados abaixo do valor limite máximo oficial (5 µg/kg). Nas 16 amostras de milho analisadas, 7 (43,8 %) continham DON, com teores compreendidos entre 255 e 715 µg/kg, abaixo do valor máximo oficial –Recomendação da Comissão N<sup>o</sup> 576 de 17 de Agosto de 2006, (8000 µg/kg). Os métodos adoptados revelaram-se adequados às características das matrizes analisadas.

## 2. INTRODUÇÃO

As micotoxinas são toxinas produzidas por fungos em determinadas condições ecológicas (temperatura, grau de humidade, stress, etc.) que podem colonizar diferentes tipos de géneros alimentícios. Estas toxinas são bastantes resistentes a tratamentos térmicos, utilizados no processamento alimentar, como são a pasteurização, a esterilização ou a congelação.

As micotoxinas podem afectar profundamente a saúde da maioria das espécies animais, mas os seus efeitos são particularmente notáveis em animais produzidos intensivamente – bovinos (vitelos), suínos e aves – desde que o maneio alimentar consista numa elevada ingestão de alimentos compostos [1].

O objectivo deste trabalho foi desenvolver dois métodos de validação interna, aplicados a determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> e deoxinivalenol por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) com purificação prévia por imunoafinidade. As matrizes escolhidas foram alimentos compostos para bovinos leiteiros, para a aflatoxina B<sub>1</sub> e milhos, para o deoxinivalenol.

## 3. MATERIAIS E REAGENTES

Para avaliar o desempenho da técnica de determinação de AFB<sub>1</sub> e DON, foram analisadas 30 amostras de alimentos compostos, obtidos de fábricas de rações nacionais (AFB<sub>1</sub>) e 16 amostras de milho em grão inteiro, obtidas no comércio retalhista (DON).

No presente trabalho utilizaram-se padrões de AFB<sub>1</sub> e DON (Sigma-Aldrich, Espanha). As colunas de imunoafinidade foram obtidas de Vicam (Watertown, EUA).

#### 4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Procederam-se às determinações da gama de trabalho, rectas de calibração e respectiva linearidade, limites de detecção e limites de quantificação;

Foram utilizadas diferentes concentrações de amostra padrão de AFB<sub>1</sub> e DON, nomeadamente, 0,175, 0,300, 0,425 e 0,550 ng AFB<sub>1</sub>/ml fase móvel e 0, 100, 200, 300, 400 e 800 ng DON/ml de fase móvel. Contaminaram-se matrizes naturais com AFB<sub>1</sub>, com concentrações que variaram entre 0,40 e 2,0 µg/kg, para a determinação da percentagem de recuperação, obtendo-se valores entre 58,0 e 74,5%, no intervalo de concentrações considerado. O milho foi contaminado com DON no intervalo de concentrações entre 60 e 600 µg/kg, obtendo-se valores entre 86,5 e 126, % neste intervalo de concentrações. Os métodos são baseados em separação por HPLC, com detecção de fluorescência e UV, para AFB<sub>1</sub> e DON, respectivamente. Os métodos validados seguem as técnicas descritas em [2] para AFB<sub>1</sub> e em [3] para DON

Os testes de recuperação foram efectuados em triplicado, fortificando amostras brancas, com AFB<sub>1</sub> e DON, de alimentos compostos para bovinos leiteiros e milhos respectivamente em cinco níveis de concentrações diferentes. As amostras de alimentos compostos para bovinos foram fortificadas com concentrações de 0,40, 0,50, 0,60, 1,0 e 2,0 µg de AFB<sub>1</sub>/ml, as amostras de milho foram fortificadas com concentrações de 60, 100, 200, 500 e 600 µg de DON/ml.

#### 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o desempenho do método de análise em causa, os valores de desvio padrão relativo (RSD, %) e de recuperação (%) devem respeitar os critérios definidos pelo Reg. [4] de 23 de Fevereiro, no que diz respeito às micotoxinas AFB<sub>1</sub> e DON. De acordo com os resultados de recuperação de AFB<sub>1</sub> e DON (Quadros 1 e 2) é possível afirmar que a percentagem de recuperação está dentro dos limites estabelecidos. Os valores de RSD, em condições de repetibilidade, variaram entre 0,27% e 0,91%, para AFB<sub>1</sub> e 5,9% e 15,6%, para DON (Quadros 1 e 2), sendo significativamente inferiores aos recomendados pela União Europeia.

O parâmetro HorRat reflecte o grau de precisão do método analítico. Os valores calculados com base na equação de Horwitz [5] e apresentados nos Quadros 2 e 3, respectivamente para AFB<sub>1</sub> e DON são, na sua maioria, inferiores a 0,5, o que indica um grau de precisão bastante elevado, para os dois métodos analíticos em estudo.

**Quadro 1-** Valores de recuperação, de RSD e do parâmetro de HorRat<sub>r</sub> obtidos em amostras fortificadas com AFB<sub>1</sub> em diferentes níveis, utilizando o método de colunas de imunoafinidade.

| Fortificação (µg/kg) | Concentração média (mg/kg) <sup>a</sup> | Recuperação (%) | RSD (%) | HorRat <sub>r</sub> |
|----------------------|---|-----------------|---------|---------------------|
| <b>0.40</b>          | 0,28 ± 0,27                             | 69,9 ± 68,1     | 0,91    | 0,017               |
| <b>0.50</b>          | 0,37 ± 0,36                             | 74,5 ± 72,5     | 0,43    | 0,008               |
| <b>0.60</b>          | 0,35 ± 0,34                             | 58,0 ± 56,4     | 0,48    | 0,009               |
| <b>1.0</b>           | 0,74 ± 0,72                             | 73,9 ± 72,0     | 0,82    | 0,017               |
| <b>2.0</b>           | 1,32 ± 1,38                             | 70,8 ± 68,9     | 0,27    | 0,006               |

<sup>a</sup> n= 3 réplicas

**Quadro 2-** Valores de recuperação, de RSD e do parâmetro de HorRat<sub>r</sub> obtidos em amostras fortificadas com DON em diferentes níveis, utilizando o método de colunas de imunoafinidade.

| Fortificação (µg/kg) | Concentração média (µg/kg) <sup>b</sup> | Recuperação (%) | RSD (%) | HorRat <sub>r</sub> |
|----------------------|---|-----------------|---------|---------------------|
| <b>60</b>            | 52,1 ± 3,4                              | 86,8 ± 5,6      | 10,5    | 0,42                |
| <b>100</b>           | 126,1 ± 7,1                             | 126,1 ± 7,1     | 7,7     | 0,35                |
| <b>200</b>           | 172,9 ± 17,5                            | 86,5 ± 8,8      | 15,6    | 0,60                |
| <b>500</b>           | 562,0 ± 18,2                            | 107,6 ± 11,7    | 12,5    | 0,34                |
| <b>600</b>           | 552,9 ± 31,2                            | 120,6 ± 4,7     | 5,9     | 0,34                |

<sup>b</sup> n= 9 réplicas

Foram efectuadas 30 análises para confirmar a aplicabilidade da técnica de determinação de AFB<sub>1</sub> em amostras de alimentos compostos para bovinos leiteiros. Revelaram-se 2 amostras positivas (6,7 %), mas os seus níveis de contaminação (0,7 e 3,5 µg/kg) encontravam-se abaixo do limite máximo admitido (5,0 µg/kg) (Quadro 3).

**Quadro 3** – Concentração e frequência da ocorrência de AFB<sub>1</sub> em alimentos compostos para animais.

| N <sup>+</sup> /N | Concentração (µg/kg) |                       |       |                |                       |       |
|-------------------|----------------------|-----------------------|-------|----------------|-----------------------|-------|
|                   | 0,5-1,0              |                       |       | 1,1-5,0        |                       |       |
|                   | N <sup>+</sup>       | N <sup>+</sup> /N (%) | Média | N <sup>+</sup> | N <sup>+</sup> /N (%) | Média |
| 2/30 (6,7%)       | 1                    | 3,3                   | 0,7   | 1              | 3,3                   | 3,5   |

**Legenda:** N – número de amostras; N<sup>+</sup> - amostras positivas; amostras <0,5 µg/kg foram consideradas negativas

Em Portugal, existe pouca informação sobre a ocorrência natural de aflatoxinas em alimentos compostos para animais. Martins *et al.* [6], efectuaram um estudo sobre a incidência desta micotoxina em alimentos compostos para bovinos leiteiros, num período de 10 anos em Portugal. Analisaram 1001 amostras, das quais 374 encontravam-se contaminadas com AFB<sub>1</sub>. Verificaram que, desde o ano 2000, os níveis de contaminação sofreram um decréscimo significativo e desde 2003 não excederam os limites permitidos em Portugal.

Nas 16 amostras de milho utilizadas no presente trabalho para pesquisa de DON verificou-se que 7 tinham concentrações desta micotoxina abaixo do limite máximo admitido [7] (8000 µg/kg) (43,8 %) (Quadro 4).

**Quadro 4** – Concentração e frequência da ocorrência de DON em milhos importados.

| N <sup>+</sup> /N | Concentração (µg/kg) |                       |       |                |                       |       |
|-------------------|----------------------|-----------------------|-------|----------------|-----------------------|-------|
|                   | 0-90                 |                       |       | 90-8000        |                       |       |
|                   | N <sup>+</sup>       | N <sup>+</sup> /N (%) | Média | N <sup>+</sup> | N <sup>+</sup> /N (%) | Média |
| 7/16 (43,8%)      | 0                    | 0                     | -     | 7              | 43,8                  | 489,4 |

**Legenda:** N – número de amostras; N<sup>+</sup> - amostras positivas; amostras <90 µg/kg foram consideradas negativas

Num estudo realizado por Martins [8] em 1987, registaram-se 20 resultados positivos para DON em 242 amostras de matérias-primas (8,3%). Em 1995, Martins e Martins [9] relataram que, em 60 amostras de milho analisadas, 46% estavam contaminadas com DON. Martins *et al.* [10], apresentam também resultados de um rastreio a DON efectuado em 70 amostras de milhos comercializados em Portugal; destas amostras, 36 encontravam-se contaminadas (51,4%). Em 2001 [1] os mesmos autores referiram a presença de DON em 12,2% de 180 amostras analisadas.

A monitorização de micotoxinas, nomeadamente aflatoxinas e tricotecenas, nos alimentos compostos para animais assim como nos cereais, é um procedimento que tem de constituir uma rotina sistematizada. O presente trabalho contribui, assim, para este objectivo.

### Referências Bibliográficas

- [1] Martins, M. L., Martins, H. M., 2001, “Mycoflora and mycotoxins incidence in raw materials (1996/2000)”, Livro de Congresso Micro, p.160
- [2] ISO/FDIS 17375, 2006, “*Animal Feeding Stuffs – Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>*”
- [3] Stroka, J., Derbyshire, M., Mischke, C., Ambrosio, M., Kroeger, K. e Arranz, I., 2006, “Liquid Chromatographic Determination of Deoxynivalenol in Baby Food and Animal Feed: Interlaboratory Study”, J. of AOAC International, Vol. 89, No. 4, p. 1012-1020
- [4] Reg. (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro, J. Oficial da União Europeia, L. 70/12
- [5] Horwitz, W. e Albert, A., “*The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision*”, J. of AOAC International Vol. 89, No. 4, p. 1095-1109. Statistical Analysis
- [6] Martins, H. M., Guerra, M. M., Bernardo, F., 2006, “Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in dairy cow’s feed over 10 years in Portugal (1995-2004)”, Rev. Ibero-Americana, *In press*
- [7] Recomendação da Comissão N° 576 de 17 Agosto de 2006, J. Oficial da União Europeia, L. 229/7 - 229/9
- [8] Martins, M. L., 1987, “Estudo preliminary da incidência de deoxinivalenol (vomitoxina) nas matérias-primas e alimentos compostos para animais”, Rep. Trab. LNV, XIX, p. 79-86
- [9] Martins, M. L., Martins, H. M., 1995, “Screening for Fusarium mycotoxins in corn-International Seminar on Fusarium, Mycotoxins Taxonomy and Pathogenicity”, Martina Franca (Italy), Book of Abstracts, p. 22
- [10] Martins, M. L., Martins, H. M. e Gimeno, A., 1996, “Ocorrência natural de fumonisinas e de deoxinivalenol em milhos comercializados em Portugal”, Rev. Port. de Ciências Veterinárias, Vol. XCI, No. 518, p. 88-90.



# VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA POR EAA/AE PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CRÓMIO TOTAL E CRÓMIO HEXAVALENTE EM COGUMELOS

Figueiredo, A. E.; Soares, M. E.; Baptista, P.; Castro, M.; Bastos, M. L.\*  
REQUIMTE / Serviço de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto  
R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

**Palavras – Chave:** cogumelos, crómio total, crómio hexavalente, Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica

**Resumo:** Os cogumelos têm sido utilizados como bioindicadores da contaminação ambiental provocada por alguns metais pesados, tais como, o cádmio, cobre, chumbo, crómio, mercúrio e zinco. Vários autores referem que foram observadas grandes concentrações de metais pesados nestes macromicetes colhidos em zonas muito poluídas, como sejam, a proximidade de estradas com muito trânsito, zonas industriais onde haja emissão de gases e resíduos, bem como, zonas próximas de fundições e minas.

Os mecanismos de acumulação dos metais presentes nos cogumelos ainda não são bem conhecidos, mas pensa-se que estão associados à formação de quelatos com grupos sulfidrilo nomeadamente, péptidos, aminoácidos ou ácidos orgânicos.

Neste trabalho foram estudadas algumas espécies como, *Tricholoma acerbum*, *Macrolepiota procera*, *Lactarius deliciosus* e *Amanita spp.*, por serem boas indicadoras de bioacumulação dos metais pesados presentes em grande quantidade nos solos de zonas muito poluídas. Os cogumelos para análise e os solos adjacentes aos mesmos foram colhidos nas regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes.

A técnica de Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica foi devidamente validada para o doseamento de crómio total e crómio hexavalente em cogumelos (precisão e exactidão, limite de detecção e quantificação e estudo de interferências).

A preparação das amostras consistiu na dissolução ácida para a determinação de crómio total, e na extracção em meio alcalino para o crómio hexavalente, com controlo de todas as fontes de contaminação.

Com o fim de comparar os níveis de crómio presentes nas diferentes partes constituintes dos cogumelos, as amostras foram separadas em chapéu, pé e em alguns casos, volva.

Os resultados obtidos para crómio total e crómio hexavalente foram analisados na perspectiva da possível influência da região onde se efectuou a colheita, da contaminação provocada pelo solo e da diferença entre as espécies micorrízicas e saprófitas.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da actividade antropogénica ao nível da agricultura e da indústria, a presença de metais pesados tem aumentado no meio ambiente. Diariamente grandes quantidades destes elementos são lançados na água, ar e solo que, por fim, são absorvidos pelos organismos vivos. Desde há muito tempo, que se tem verificado a presença de poluentes ambientais em peixes, fungos e outros seres vivos, e desde aí, surgiu a necessidade da urgente protecção ambiental.

Vários metais pesados, já mencionados por alguns autores [1-4] foram doseados em cogumelos edíveis, como o cádmio, chumbo, mercúrio, ferro, níquel, prata, cobre, cobalto e zinco. A relação existente entre a quantidade de metal contido no cogumelo e o substrato

depende de vários factores, entre os quais, o tipo de metal, a espécie do cogumelo, a sua ecologia, a constituição do solo, o local proveniente do fungo, entre outros [2-4].

O crómio é um dos contaminantes presentes no ambiente, no qual existe principalmente sob a forma de crómio trivalente [Cr(III)] e hexavalente [Cr(VI)]. A fonte de contaminação da última forma deste metal é essencialmente de origem industrial, proveniente de refinarias petrolíferas, e indústria eléctrica [5-7].

Este trabalho teve como finalidade validar uma técnica para o doseamento de Cr total e hexavalente em cogumelos, por Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica (EAA/AE).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies utilizadas para a realização deste trabalho foram colhidas, com ajuda de material não metálico, em várias zonas das regiões da Beira Interior e de Trás-os-Montes. Na beira Interior foram colhidas 16 amostras, sendo 3 saprófitas (*Agaricus silvicola* (1) e *Volvariella speciosa* (2)), e 12 micorrízicas (*Amanita rubescens* (1), *Amanita ponderosa* (8), e *Boletus regius* (3)). Em Trás-os-Montes foram colhidas 20 amostras das quais, 6 eram saprófitas (*Hypholoma fasciculare* (1), *Leucopaxillus gigantus* (1), *Macrolepiota procera* (4)), e 14 micorrízicas (*Amanita muscaria* (2), *Lactarius deliciosus* (4), *Lactarius piperatus* (1), *Lactarius vellenus* (1), *Suillus granulatus* (1), *Suillus luteus* (1) e *Tricholoma acerbum* (4)). As amostras previamente desidratadas foram submetidas a uma digestão ácida para a quantificação Cr total e a uma extracção alcalina para o doseamento crómio hexavalente sendo posteriormente analisadas por EAA/AE.

A técnica de EAA/AE foi devidamente validada, determinando-se a precisão e exactidão, limite de detecção e quantificação, bem como o estudo de interferências

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método implementado para o doseamento de crómio total e hexavalente apresenta uma boa repetibilidade, com coeficiente de variação inferior a 10% e percentagens de recuperação superiores a 90%.

A técnica foi aplicada no doseamento de crómio total e crómio hexavalente em 36 amostras de cogumelos e 36 amostras de solo.

Os valores encontrados nas amostras de cogumelos variam entre 0.02 – 13.84 µg/g e <0.0085 – 0.58 µg/g no chapéu e 0.04 – 6.50 µg/g e <0.0085 - 0.81 µg/g no pé, para crómio total e crómio hexavalente, respectivamente. No solo os valores encontrados variam entre 5.75 – 343 µg/g e 0.069 – 1.78 µg/g para crómio total e crómio hexavalente, respectivamente. Não se notaram diferenças significativas nos conteúdos em crómio total nos cogumelos colhidos na Beira Interior e os de Trás-os-Montes. Também não se encontraram diferenças entre as espécies saprófitas e micorrízicas para este elemento.

Ao comparar-se a quantidade de crómio hexavalente nas diferentes estruturas dos cogumelos saprófitas, verificou-se que a concentração encontrada nos pés era superior ao dos chapéus. Esta diferença também se verificou nos cogumelos colhidos em Trás-os-Montes.

#### 4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Manuel Pires Henriques, Sr. António José Correia Pereira, Sr. José Luís Leite Chapado e ao Eng. José António Figueiredo a recolha das amostras e também ao Dr. João Marques, Eng. Lopes Dias e ao Eng. Carlos Felício, da Direcção Regional da Agricultura da Beira Interior, DRABI a recolha e a identificação dos cogumelos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] – G.M. Gadd. “Interaction of fungi with toxic metals”. *New Phytol.* **124** (1993) 25-60
- [2] – J. Alonso , M.J. Salgado, M.A. Garcia, M.J. Melgar - “Accumulation of mercury in edible macrofungi: Influence of some factors”. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **38** (2000) 158-162
- [3] – P. Kalac, L. Svoboda - “A review of trace element concentrations in edible mushrooms”. *Food Chemistry.* **69** (2000) 273-281
- [4] – D. Michelot , E. Siobud, J.C. Dore, C. Viel, F. Poirier - “Update on metal content profiles in mushrooms – toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation”. *Toxicon.* **36 (12)** (1998) 1997-2012
- [5] V.K. Gupta, A.K. Shivastava, N. Jain - “Bioprospection of Chromium(VI) from aqueous solution by green algae *Spirogyra* species”. *Wat. Res.* **35 (17)** (2001) 4079-4085
- [6] N.S. Bolan, D.C. Adriano, R. Natesan, B-J. Koo -“Effects of Organic Amendments on the Reduction and Phytoavailability of Chromate in Mineral Soil”. *J. Environ. Qual.* **32** (2003) 120-128
- [7] V.K. Singh, P.N. Tiwari - “Removal and Recovery of Chromium(VI) from Industrial Waste Water”. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69** (1997) 376-382

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS POR HPLC

*Takemoto<sup>1</sup>, E.; Prado<sup>1</sup>, M.A.; \*Godoy<sup>2</sup>, H.T.*

<sup>1</sup>Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos, São Paulo/SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências de Alimentos, Fac.de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil.  
[\\*helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)

As alterações que os óleos e gorduras sofrem são decorrentes de reações químicas que levam o alimento à deterioração. Uma das reações de maior importância, tanto do ponto de vista econômico como nutricional, é a oxidação. Maneiras de minimizar a reação de oxidação é a utilização de antioxidantes sintéticos que são aditivos alimentares que servem para prevenir ou retardar a oxidação lipídica dos alimentos. Essas substâncias tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária e estão sujeitas a legislações específicas de cada país ou por normas internacionais. Portanto, é de fundamental importância desenvolver e validar um método analítico capaz de monitorar os níveis de antioxidantes presentes nos alimentos para garantir que essas substâncias estejam sendo utilizadas dentro de padrões de qualidade aceitáveis para o consumo. Neste estudo, a metodologia foi desenvolvida e validada para a análise simultânea de antioxidantes sintéticos, como galato de propila (PG), terc-butilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA), galato de octila (OG) e butilhidroxitolueno (BHT) em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas. Para análise desses antioxidantes sintéticos utilizou-se a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). No processo cromatográfico utilizou-se coluna C18 (Chromolith), fase móvel composta por metanol:água (com adição de ácido acético a 5% ajustando-se o pH a 3,1). A eluição dos antioxidantes foi realizada utilizando no início da corrida 55% de metanol, chegando a 87% em 10 minutos, voltando as condições iniciais de corrida em 15 minutos e permanecendo nessas condições até 20 minutos, a uma vazão de 0,8 mL/min. A detecção foi feita a 280 nm e a quantificação, por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação acima de 90% para todos os antioxidantes, além de boa linearidade e repetibilidade, com limites de detecção de 4,96, 3,09, 0,61, 1,13 e 2,36 para o BHT, BHA, PG, OG e TBHQ, respectivamente.

# VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS: PRODUÇÃO DE COGUMELOS DO GÉNERO *Pleurotus* EM PALHA DE ARROZ E EM POLPA DE CAFÉ

Fernando, A.<sup>1\*</sup>, Mendes, B.<sup>1</sup>, Oliveira, J. F.<sup>1</sup>, Vega, A.<sup>2</sup>, Molina, J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Biotecnologia Ambiental, Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal

Tel +351-212 948 543 Fax +351-212 948 543 e-mail: [ala@fct.unl.pt](mailto:ala@fct.unl.pt)

<sup>2</sup>Universidad de Chiriqui, Panamá

<sup>3</sup>Univ. Autonoma de Occidente, Panamá

**Palavras-chave:** valorização de resíduos, cogumelos, resíduos agrícolas, qualidade alimentar

**Resumo:** A valorização de recursos agro-florestais pode, entre outras alternativas existentes, ser efectuada através da produção de cogumelos. O principal objectivo deste estudo foi a bioconversão de resíduos provenientes das indústrias agroalimentares, nomeadamente, indústrias do arroz e do café, por fermentação em substrato sólido, com a finalidade da produção de cogumelos comestíveis do género *Pleurotus*. As amostras de cogumelos foram colhidas em diversas regiões da República do Panamá, nomeadamente nas províncias de Chiriquí, Coclé, Ngobe Bugle e Darien. Os resíduos valorizados por esta via correspondem a materiais obtidos de culturas dominantes naquela zona, concretamente palha de arroz e polpa de café. Foi determinada a produção de carpóforos e, também, as características nutricionais dos cogumelos produzidos (teores de cinzas, proteínas, lípidos e celulose). Pode afirmar-se que se detectaram diferenças, quer em termos de produção quer em termos da sua caracterização nutricional, entre as amostras estudadas, umas ligadas às características genéticas das estirpes, outras ligadas à origem regional das estirpes e outras resultantes dos substratos utilizados. No entanto, a influência dominante, e estatisticamente com significado, foi a do genoma. Verificou-se que os cogumelos produzidos contém baixo teor de lípidos e elevado teor em proteínas. A estirpe que apresenta modificações nutricionais mais marcadas em função do substrato utilizado é a 645/59, de origem na província de Chiriquí, pelo que seria interessante ensaiar a sua multiplicação sobre outros substratos de modo a avaliar as suas potencialidades neste domínio. O teor em Azoto é o parâmetro que conduz a uma maior diferenciação do comportamento das estirpes, circunstância que importará analisar com base na composição em aminoácidos e noutros aspectos estruturais das proteínas aí presentes.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção agrária é indissociável da problemática ambiental, na dupla perspectiva da gestão sustentável dos recursos e da segurança alimentar/qualidade dos produtos. A produção de cogumelos insere-se nesta problemática, pois permite reduzir os custos económicos e ambientais dos actos produtivos, através da produção de novos produtos o que representa um incremento das mais valias pela diversificação e pela qualidade [1]. O principal objectivo deste estudo foi a bioconversão de resíduos provenientes das indústrias agroalimentares, nomeadamente indústrias do arroz e do café, por fermentação em substrato sólido, com a finalidade da produção de cogumelos comestíveis do género *Pleurotus*. Neste sentido, o presente trabalho resulta da aplicação de novas tecnologias capazes de reciclar, reutilizar e transformar uma parte da biomassa residual das actividades agrícolas, em

alimentos utilizáveis pelo homem e/ou animais, contribuindo para a redução da poluição ambiental ocasionada pela acumulação desses resíduos.

Este estudo foi realizado no âmbito do Projecto IV.18 do Programa CYTED, que desenvolve actividades na área da cultura em substratos lenhocelulósicos de diversos fungos colectados em diversas zonas da América Latina. No caso presente as amostras estudadas foram colectadas no Panamá, sendo os espécimens registados no Instituto de Ecologia do México e no Laboratório de Recursos Naturais do Panamá. A sua cultura foi efectuada na Universidade de Chiriquí daquele país, sobre diversos resíduos agro-florestais, nomeadamente em palha de arroz e em polpa de café, e posteriormente analisados química e bromatologicamente em Portugal nos Laboratórios da Unidade de Biotecnologia Ambiental da Universidade Nova de Lisboa. Os dados agora apresentados são preliminares, esperando-se apresentar em breve novas informações relativamente às amostras em causa. Numa fase posterior proceder-se-á à pesquisa de princípios farmacológicos activos em colaboração com um laboratório associado, especializado neste domínio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram colhidas nas regiões de Chiriquí, Coclé, Ngobe Bugle e Darien, na República do Panamá. Os resíduos valorizados por esta via correspondem a materiais obtidos de culturas dominantes na região de Chiriquí, concretamente palha de arroz e polpa de café.

Os cogumelos foram secos a 60°C, em estufas com circulação forçada de ar, durante 24h, sendo, depois dessa operação, sujeitos a moenda para seguidamente serem analisados quimicamente. Foram determinados nos carpóforos os teores de humidade, cinzas, gordura bruta, N-Kjeldahl e celulose bruta. Os glúcidos totais foram calculados por diferença entre a matéria seca e a soma da proteína bruta com a gordura bruta e as cinzas. A proteína bruta foi calculada multiplicando o teor de N-Kjeldahl pelo factor 4,38, comumente utilizado para o caso dos cogumelos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Tabela 1** mostra o número de registo dos carpóforos e a sua origem.

**Tabela 1** – Identificação e origem das estirpes de *Pleurotus djamor* cultivadas

| Número de Registo<br>Instituto Ecologia do México/Laboratório Recursos Naturais do Panamá | Origem      |
|---|-------------|
| 275/20, 134/32, 643/43, 645/59, 646/62  | Chiriquí    |
| 647/66, -/74  | Coclé       |
| -/78  | Ngobe Bugle |
| 653/80, 655/81, 656/82, 648/83, 649/84, 650/85, 651/86                                    | Darien      |

Na **Tabela 2** e na **Figura 1** compara-se a produção de *Pleurotus djamor* de diferentes origens, nos diferentes substratos (em % da produção total obtida no ensaio).

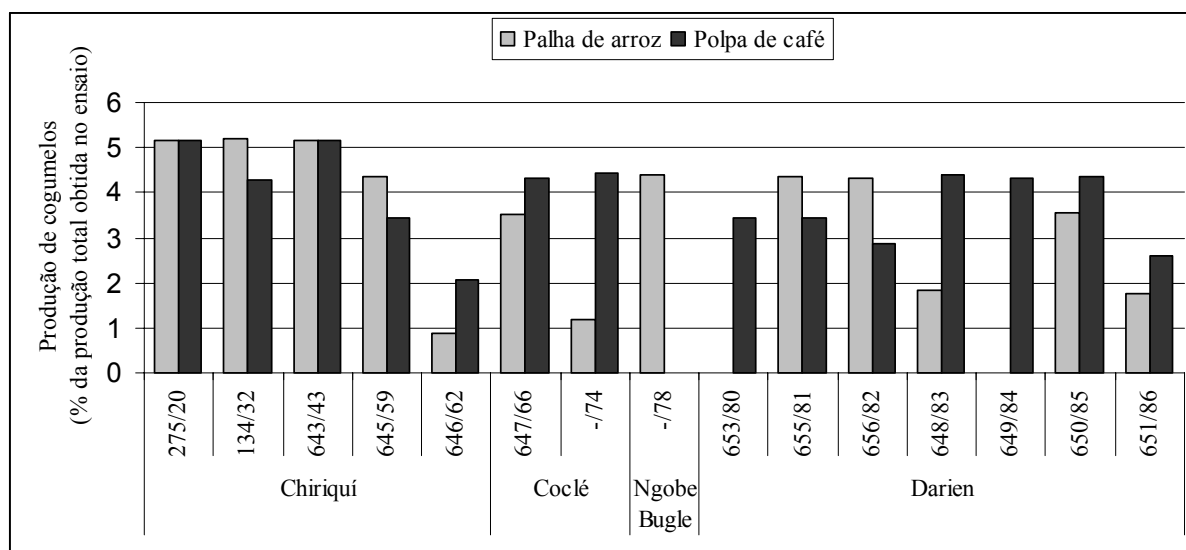
Observando a **Tabela 2** e a **Figura 1**, verifica-se que a produção de *Pleurotus djamor* foi superior em estirpes com origem na província de Chiriquí, seguindo-se a produção obtida com estirpes provenientes da província de Coclé e de Darien. A única estirpe com origem na comarca de Ngobe Bugle (registada com o nº -/78) apresentou os menores valores de produtividade (principalmente devido ao facto desta estirpe não se ter desenvolvido nos resíduos de café). É de salientar, também, que as estirpes com os números 653/80 e 649/84,

com origem em Darien, também não se desenvolveram em palha de arroz. No entanto, estas diferenças de produtividade observadas, entre estirpes de diferentes regiões, não são estatisticamente significativas (ANOVA – Análise de Variância). Não foram observadas, igualmente, diferenças significativas nas produtividades de *Pleurotus* obtidas nos dois substratos em análise, palha de arroz e polpa de café.

**Tabela 2** – Produção de *Pleurotus djamor* de diferentes origens, nos diferentes substratos (% da produção total obtida no ensaio)

| Origem      | Palha de arroz | Polpa de café | Valor médio |
|-------------|----------------|---------------|-------------|
| Chiriquí    | 4,2 ± 1,9      | 4,0 ± 1,3     | 4,1 ± 1,5   |
| Coclé       | 2,4 ± 1,2      | 4,4 ± 0,1     | 3,4 ± 1,5   |
| Ngobe Bugle | 4,4 ± 1,2      | -             | 2,2 ± 2,2   |
| Darien      | 2,3 ± 1,9      | 3,6 ± 0,7     | 2,9 ± 1,5   |
| Valor médio | 3,3 ± 1,1      | 3,0 ± 2,0     | 3,1 ± 1,6   |

A influência dominante, na variabilidade das produções obtidas, parece ser tendencialmente o predomínio do genoma (**Figura 1**). Em relação às estirpes provenientes de Chiriquí, a 646/62 foi a que apresentou a menor produtividade, sobretudo em palha de arroz, não se verificando diferenças entre as outras estirpes. A estirpe registada com o número -/74, com origem em Coclé, e as estirpes provenientes de Darien, com os números de registo 648/83 e 651/86, apresentaram também produções reduzidas, principalmente em palha de arroz.



**Figura 1** – Produção de *Pleurotus djamor* de diferentes origens, nos diferentes substratos (% da produção total obtida no ensaio)

Na **Tabela 3** apresenta-se a composição nutricional das amostras de *Pleurotus* analisadas. Analisando os resultados obtidos verifica-se que de entre os nutrientes presentes nos carpóforos destacam-se os teores de lípidos que são reduzidos, cerca de 2,0% e os teores de proteínas que são bastante elevados (entre 20 e 33%), quando comparados com outros alimentos. A composição nutricional de cada estirpe de *Pleurotus djamor* não variou significativamente em função dos diferentes substratos. Verificou-se, no entanto, que as estirpes produzidas em polpa de café apresentaram teores superiores em cinzas e celulose e as estirpes produzidas em palha de arroz, teores superiores em proteína e lípidos. Em relação à origem regional das estirpes, também não se verificaram diferenças significativas em termos

da sua composição. No entanto, as estirpes com origem em Chiriquí e Ngobe Bugle foram as que apresentaram simultaneamente os teores mais elevados de proteínas e os teores mais reduzidos de lípidos. As estirpes com origem em Chiriquí, assim como as de origem em Darien, foram as que apresentaram os teores mais elevados de celulose. Obtiveram-se teores mais elevados de cinzas nas estirpes com origem em Darien e Ngobe Bugle. Salienta-se, no entanto, que estas tendências não foram estatisticamente significativas.

**Tabela 3** – Composição nutricional das amostras de *Pleurotus djamor* analisadas (% matéria seca)

| Origem      | Substrato      | Cinzas    | Proteínas  | Lípidos   | Glúcidos | Celulose  |
|-------------|----------------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|
| Chiriquí    | Palha de arroz | 8,4 ± 1,1 | 25,6 ± 4,2 | 2,0 ± 1,3 | 64 ± 5   | 3,8 ± 2,1 |
|             | Polpa de café  | 7,9 ± 0,7 | 23,6 ± 2,1 | 1,5 ± 0,2 | 67 ± 3   | 3,5 ± 1,5 |
| Coclé       | Palha de arroz | 8,7 ± 1,7 | 22,7 ± 0,1 | 2,4 ± 0,3 | 66 ± 2   | 1,1 ± 0,9 |
|             | Polpa de café  | 7,6 ± 0,8 | 22,1 ± 0,3 | 2,3 ± 0,3 | 68 ± 0   | 2,2 ± 1,6 |
| Ngobe Bugle | Palha de arroz | 9,1 ± 1,4 | 25,7 ± 1,6 | 1,7 ± 0,5 | 63 ± 2   | 1,6 ± 0,7 |
|             | Polpa de café  | -         | -          | -         | -        | -         |
| Darien      | Palha de arroz | 7,2 ± 0,7 | 22,6 ± 1,4 | 2,4 ± 0,4 | 68 ± 1   | 2,0 ± 1,5 |
|             | Polpa de café  | 9,4 ± 2,1 | 22,1 ± 1,4 | 2,1 ± 0,4 | 66 ± 2   | 3,5 ± 2,0 |
| Valor médio |                | 8,3 ± 1,5 | 23,3 ± 2,5 | 2,0 ± 0,7 | 66 ± 3   | 2,9 ± 1,8 |

Por outro lado, verificou-se uma elevada variabilidade na composição nutricional de estirpes com origem na mesma região. Por exemplo, em Chiriquí, uma das estirpes obtida em palha de arroz (645/59), doseou 32,6% de Proteína bruta, expressa em matéria seca e outra, obtida também em palha de arroz (646/62), 4,14% de Lípidos. A estirpe que apresenta modificações nutricionais mais marcadas em função do substrato utilizado é a 645/59, de origem na província de Chiriquí, pelo que seria interessante ensaiar a sua multiplicação sobre outros substratos de modo a avaliar as suas potencialidades neste domínio. O teor em Azoto é o parâmetro que conduz a uma maior diferenciação do comportamento das estirpes, circunstância que importará analisar com base na composição em aminoácidos e noutros aspectos estruturais das proteínas aí presentes.

#### 4. CONCLUSÕES

A determinação da produção e do valor alimentar dos carpóforos, traduz uma variabilidade reduzida do ponto de vista global, em especial se tivermos em conta a existência de três causas de variação significativas sobrepostas: a variabilidade genética, a variabilidade regional e a diferença de substratos utilizados. A influência dominante parece ser a do genoma embora a influência do substrato utilizado seja também relevante. A variabilidade do material indicia, portanto, estudos suplementares de grande interesse potencial.

#### Referencias

- [1] – Vega, A., Molina, J., Fernando, A., Duarte, P., Reboredo, F., Morais, J., Oliveira, J.S. (2005) Resultados preliminares da caracterização de diversas amostras de *Pleurotus*, recolhidos no Panamá. In: Dianese, J.C., dos Santos, L.T.P (eds) *Anais do V Congresso Latino Americano de micologia*, 1-5 Agosto 2005, Brasília, Brasil, Associação Latino Americana de Micologia, pp 170-172 e 268.



# VARIAÇÃO DO VALOR NUTRICIONAL E PERFIL LIPIDICO DE CAPRINOS SERRANOS ECÓTIPO JARMELISTA EM FUNÇÃO DA MATURIDADE

Ribeiro\*, A.; Viegas\*, T.; Monteiro\*, A.; Silva\*\*, S.; Azevedo\*\*, J.; Teixeira+, A.; Castilho\*\*\*, M.C.; Ramos, F.\*\*\* e Silveira\*\*\*, M.I.

\*ESAV Escola Superior Agrária de Viseu, Quinta da Alagoa, 3500-606 Viseu

\*\*UTAD Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta dos Prados, 5001-801 Vila Real

+ESAB Escola Superior Agrária de Bragança, Quinta de S. Apolónia, 5301-855 Bragança

\*\*\*FF-UC Faculdade Farmácia Universidade Coimbra, Rua do Norte 3000-295 Coimbra, Portugal

## INTRODUÇÃO

Os caprinos são animais com teores de gordura bastante baixos. Vários autores indicaram que o conteúdo em gordura dos caprinos é inferior em 47 e 54% em relação à dos bovinos e dos ovinos [1]. Os Caprinos são especialmente uma fonte de carne magra, o que se torna importante para a prevenção de doenças cardiovasculares. Baseando-nos em publicações científicas e, de acordo com a classificação da carne dada pelo efeito potencial de o teor lipídico vir a aumentar, diminuir ou mesmo ter efeito neutro sobre os teores de colesterol, verifica-se que os caprinos possuem, em média, melhores valores que os bovinos e suínos [2]. Banskalieva *et al.* (2000) também referem que é necessário mais experimentação para a caracterização de interações entre factores como a raça, idade e a condição nutricional no perfil lipídico dos caprinos para uma melhor entendimento da sua qualidade da carne. Pouco se conhece sobre o perfil lipídico da carne de caprinos, mas alguns estudos indicam que o oleico, palmítico, esteárico e o linoleico são os ácidos que predominam nos músculos. Os caprinos têm maiores concentrações de ácidos gordos polinsaturados que os ovinos e bovinos, mas menores que os suínos [2]. Rhee (1992) refere que os caprinos têm maiores concentração de ácidos gordos desejáveis que os bovinos e ovinos, mas com níveis semelhantes à carne magra de suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve como objectivo caracterizar a carne de carcaças de caprinos machos com 40% e 30% de maturidade (Tabela 1). Utilizaram-se 6 caprinos machos da raça serrana ecótipo jarmelista, em que após o desmame os cabritos foram separados em dois grupos de 3 animais, 30% e 40% de maturidade. Os pesos vivos ao abate do grupo de 40% de maturidade foi de 22,4 ± 1,06 Kg com idade de 202 ± 16,7 dias e o de 30% de maturidade 16,9 ± 0,578kg com idade de 160 ± 59 dias. Todos os grupos tiveram acesso ao pasto e a suplemento de modo a garantir um programa alimentar que satisfizesse as necessidades de manutenção e crescimento, até que o animal atingisse o peso de abate, ou seja, o grau de maturidade a que ia ser abatido.

Atingido o grau de maturidade esperado, os animais eram abatidos depois de um jejum de 24 horas.

O músculo, a gordura subcutânea e a gordura intermuscular de cada carcaça obtidos por dissecação, foram triturados e homogeneizados de forma a obter uma amostra de músculo e de gordura (gordura subcutânea com a gordura intermuscular). A determinação da Humidade foi realizada pelo método II da Norma Portuguesa – 1614 (1979). A determinação da proteína bruta foi efectuada pelo método de Kjeldhal, segundo a Norma Portuguesa – 1612. Para a determinação da gordura utilizou-se método de Soxhlet, segundo a Norma Portuguesa – 1224

(1982). A determinação dos ácidos gordos das amostras foi feita através de cromatografia em fase gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC\_FID).

Tabela 1: Peso vivo e idade dos caprinos

| Maturidade % | PV (g)             | Idade (dias)   |
|--------------|--------------------|----------------|
| 40           | 22400,00+/-1058,30 | 202,00+/-16,70 |
| 30           | 16933,33+/-577,35  | 160,33+/-59,07 |

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de proteína no músculo, tanto no grupo de 40% de maturidade como no de 30%, foram idênticos representando cerca de 21%. Já a gordura do músculo teve valores baixos representando 0,67% e 0,46% respectivamente para o grupo de 40% e 30% de maturidade. O valor da gordura na gordura do animal representou 44,53% no grupo de 40% de maturidade e 39,65% no outro grupo (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios da análises ao músculo e à gordura das carcaças

| Maturidade % | Musculo    |           |            |             |         | Gordura    |           |
|--------------|------------|-----------|------------|-------------|---------|------------|-----------|
|              | Humidade % | Gordura % | Proteína % | P (mg/100g) | Cinza%  | Humidade % | Gordura % |
| <b>40</b>    | 74,43      | 0,67      | 21,15      | 416,08      | 1,19    | 39,23      | 44,53     |
|              | +/-1,10    | +/-0,29   | +/-1,43    | +/-57,77    | +/-0,03 | +/-2,42    | +/-6,08   |
| <b>30</b>    | 74,25      | 0,46      | 21,25      | 314,85      | 1,26    | 39,88      | 39,65     |
|              | +/-0,44    | +/-0,08   | +/-2,00    | +/-74,32    | +/-0,07 | +/-2,36    | +/-3,60   |

Em relação aos ácidos gordos (Tabela 3), verificou-se que em ambos os grupos (30%-40% de maturidade) os mais importantes foram C 18:1 cis n-9 (34%-37%), C 16:0 (26,39-24,89%) e C 18:0 (17,48-18,07%). O teor total de ácidos gordos saturados, para o grupo de 30 e 40% de maturidade, foi de 53,11% e de 49,61%, respectivamente. Os valores de ácidos gordos monoinsaturados foi de 42,39% e de 47,05% enquanto que para os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) os teores foram de 4,27% e de 2,65%. Os isómeros conjugados do ácido linoleico (CLA's) representaram em ambos os grupos cerca de 1% dos ácidos gordos totais (Tabela 4).

Tabela 3: Composição em ácidos gordos das amostras analisadas

|                                       | Grau de maturidade |               |       |               |
|---------------------------------------|--------------------|---------------|-------|---------------|
|                                       | 40                 |               | 30    |               |
|                                       | Média              | Desvio padrão | Média | Desvio padrão |
| C 10:0                                | 0,37               | 0,29          | 0,28  | 0,16          |
| C 12:0                                | 0,69               | 0,57          | 0,87  | 0,49          |
| C 14:0                                | 5,42               | 3,29          | 7,66  | 3,51          |
| C 14:1 <i>cis</i>                     | 6,08               | 5,85          | 2,73  | 3,52          |
| C 15:0                                | n.d.               | n.d.          | 0,77  | n.d.          |
| C 15:1 <i>cis</i>                     | 0,24               | n.d.          | 0,40  | n.d.          |
| C 16:0                                | 24,89              | 5,13          | 26,39 | 4,47          |
| C 16:1 <i>cis</i> n-7                 | 2,13               | 1,19          | 1,24  | 0,15          |
| C 17:0                                | 0,22               | n.d.          | n.d.  | n.d.          |
| C 17:1 <i>cis</i>                     | 0,89               | 0,04          | 1,02  | 0,63          |
| C 18:0                                | 18,07              | 5,07          | 17,48 | 2,30          |
| C 18:1 <i>trans</i> n-11              | 2,04               | 0,28          | 1,97  | 1,21          |
| C 18:1, <i>cis</i> n-9                | 37,49              | 3,71          | 34,09 | 2,88          |
| C 18:2 <i>cis</i> n-6                 | 1,91               | 1,42          | 3,47  | 0,55          |
| C 20:0                                | n.d.               | n.d.          | 0,40  | 0,16          |
| C 18:3 <i>cis</i> n-3                 | n.d.               | n.d.          | n.d.  | n.d.          |
| C 22:1 <i>cis</i> n-9                 | 0,67               | 0,22          | 1,20  | 0,30          |
| C 24:0                                | 0,25               | n.d.          | n.d.  | n.d.          |
| CLA's :                               | 1,04               | 0,40          | 1,03  | 0,51          |
| Ác. Ruménico                          | 1,41               | n.d.          | n.d.  | n.d.          |
| C 18:2 <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 | 0,79               | n.d.          | n.d.  | n.d.          |

Tabela 4: Somatório dos ácidos gordos saturados, insaturados, polinsaturados e rácio entre ácidos gordos insaturados sobre saturados

| Maturidade % | $\Sigma$ AGS % | $\Sigma$ AGI % | AGI/AGS %   | $\Sigma$ AGP % | $\Sigma$ AGM % |
|--------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|
| 40           | 49,61+/-5,42   | 49,70+/-6,07   | 1,02+/-0,23 | 2,65+/-0,34    | 47,05+/-5,16   |
| 30           | 53,11+/-7,19   | 46,66+/-6,78   | 0,91+/-0,27 | 4,27+/-0,53    | 42,39+/-7,26   |

$\Sigma$ AGS: Somatório dos ácidos gordos saturados;  $\Sigma$ AGI: Somatório dos ácidos gordos insaturados; AGI/AGS: Rácio entre os ácidos gordos insaturados e os saturados;  $\Sigma$ AGP: Somatório dos ácidos gordos polinsaturados;  $\Sigma$ AGM: Somatório dos ácidos gordos monoinsaturados

## CONCLUSÃO

Foi possível avaliar que a carne de caprino tem um teor de proteína de cerca de 21% e um baixo teor de gordura na ordem dos 40-45% para as amostras de gordura e 0,5-0,7% para o músculo, o que a torna benéfica para a saúde.

Em relação aos ácidos gordos, foram encontradas quantidades variáveis verificando-se carnes em que os teores de ácidos gordos saturados são inferiores aos ácidos gordos insaturados no grupo dos 30% de maturidade, o que pode indicar a relação ácidos gordos insaturados/ ácidos gordos saturados diminui ao longo da maturidade.

Sendo este trabalho um resultado parcial de um estudo sobre o crescimento e desenvolvimento dos caprinos, nomeadamente para verificar o efeito do sexo, grau de maturidade e tipo de alimentação nas características anatómicas e químicas da carne de caprinos, verifica-se que podemos ter ainda a confirmação destes resultados e a apresentar outros, para que deste modo se possa contribuir para o reconhecimento da mais valia que Portugal possui na produção caprina.

#### **REFERENCIAS**

- [1] - Monteiro, A. M. C., 1999. Estudo do crescimento e desenvolvimento de caprinos machos Serranos - ecotipo Transmontano. Tese de Mestrado. UTAD, Vila Real.
- [2] - Banskalieva V., T. Sahlú e A.L. Goetsch, 2000. Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: A review. *Small Ruminant Research* 37:pp 225-268
- [3] - Rhee, K.S., 1992. Fatty acids in meats and meat products. In: Chow, C.K. (Ed.), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. Marcel Dekker, New York, pp. 65±93.

## **5. RASTREABILIDADE**

---

### **5.1 Sessão Plenária**

#### **Sistemas de Rastreabilidade no Sector Agro-Alimentar**

### **5.2 Sessão de Comunicações Orais**

### **5.3 Painéis**



## **SISTEMAS DE RASTREABILIDADE NO SECTOR AGRO-ALIMENTAR**

*Pedro Costa Queiroz*

Director-Geral da FIPA  
Professor Universitário

O grande mediatismo que, durante a década de 90, foi dado a um conjunto de problemas relacionados com a segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, veio pôr em evidência as falhas na concepção e na aplicação da regulamentação alimentar na União Europeia, tendo conduzido à publicação, em Janeiro de 2000, do Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos. Neste documento, que veio influenciar decisivamente a profunda revisão legislativa que desde então tem vindo a registar-se, a rastreabilidade surge como um dos princípios gerais sobre os quais deve assentar a política europeia em matéria de segurança alimentar.

Com a publicação do Regulamento (CE) n.º 178/2002, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro, a rastreabilidade dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais aparece como um requisito geral que se traduz na capacidade de cada operador, ao longo de todas as fases da produção, transformação e distribuição, detectar a origem e seguir o rasto de um género alimentício, de um alimento para animais, de um animal produtor de géneros alimentícios ou de uma substância destinada a ser incorporada (ou com probabilidades de o ser) em géneros alimentícios ou em alimentos para animais. Após um prazo de adaptação, esta obrigação geral passou a aplicar-se no início de 2005.

Neste âmbito, os sistemas de rastreabilidade a implementar devem ter especial incidência um passo a montante e um passo a jusante, ou seja, todos os intervenientes na cadeia de abastecimento (agricultores, transformadores, transportadores e comerciantes) devem ser capazes de identificar a origem das matérias-primas e ingredientes, bem como reter a informação sobre o destino dos seus produtos (exclui-se a venda ao consumidor final).

Importa ainda referir que, sem prejuízo das normas específicas, o regulamento não obriga os operadores ao estabelecimento de um elo entre os produtos que entram e que saem, nem à conservação de registos que identifiquem a forma como os lotes são divididos e combinados dentro de uma empresa. No entanto, a existência de um sistema de rastreabilidade interna traz benefícios ao operador, contribuindo para retiradas do mercado de forma muito mais orientada e precisa e para uma redução de custos.

Embora as obrigações gerais referidas devam ser aplicadas por todos os elos da cadeia de abastecimento, existem ainda regras específicas aplicáveis a carnes de bovino, pescado, ovos, organismos geneticamente modificados e materiais de embalagem.

As primeiras exigências surgiram no sector da carne de bovino na sequência da instabilidade do mercado causada pela BSE. Actualmente todos os operadores e grupos de operadores, do mesmo ramo ou de diferentes ramos, do comércio de carne de bovino, devem dispor, em cada

fase da produção e da venda, de um sistema de identificação e registo completo. A maior transparência nas condições de comercialização, nomeadamente em relação à rastreabilidade, exerceu um efeito positivo no consumo da carne de bovino.

No sector da pesca e aquicultura os produtos só podem ser propostos para venda a retalho ao consumidor final, independentemente do método de comercialização, se uma marcação ou rotulagem adequada indicar a denominação comercial da espécie, o método de produção e a zona de captura.

No caso dos ovos a rastreabilidade é assegurada pela marcação na unidade de produção ou, o mais tardar, no primeiro centro de inspecção e classificação que tiver recebido os produtos.

Por outro lado, na sequência dos medos instalados no que respeita à utilização de organismos geneticamente modificados (OGM), foram publicadas regras comunitárias que vieram introduzir novas obrigações para a indústria agro-alimentar e para os seus fornecedores. Obrigações essas no que respeita à rastreabilidade e rotulagem de OGM e de géneros alimentícios e alimentos para animais que contenham, sejam constituídos ou sejam produzidos a partir de OGM, com o objectivo de facilitar, por um lado, a retirada dos produtos do mercado caso se observem efeitos prejudiciais para a saúde humana, dos animais ou para o ambiente, incluindo os ecossistemas e, por outro, a verificação especificamente destinada a examinar os efeitos potenciais, em especial no ambiente.

Estando excluída do Regulamento (CE) n.º 178/2002, a rastreabilidade dos materiais em contacto com os géneros alimentícios deve actualmente observar regras específicas estabelecidas na legislação comunitária.

Independentemente da evolução que a legislação comunitária tem vindo a sofrer, muitas empresas do sector agro-alimentar já haviam estabelecido procedimentos com vista a assegurar a rastreabilidade, interna e externa, dos seus produtos, nomeadamente no âmbito das suas operações logísticas e da implementação de sistemas de gestão da qualidade.

No referencial ISO 9001:2000, a rastreabilidade, definida como a capacidade de seguir a história, aplicação e localização do que estiver a ser considerado (ISO 9000:2000), aparece como uma ferramenta de gestão e de apoio à decisão, cuja extensão deve estar relacionada com o impacto de uma não-conformidade. A norma ISO 15161:2000, que estabelece as linhas de orientação para aplicação da ISO 9001:2000 na indústria alimentar e das bebidas, faz uma referência clara à importância do lote no caso de uma recolha de produto.

A norma ISO 22000:2005 sobre sistemas de gestão da segurança alimentar, refere, como requisito, que a organização deve estabelecer um sistema de rastreabilidade com base no lote e a sua relação com os registos das matérias-primas, processamento e distribuição. Dentro desta família de normas encontra-se em preparação a ISO 22005, que irá estabelecer princípios gerais e linhas de orientação para a concepção e desenvolvimento de sistemas de rastreabilidade.

Importa salientar a maior especificidade dos referenciais normativos face à legislação, nomeadamente no que toca à rastreabilidade interna e à utilização do lote. Por outro lado, o âmbito de aplicação das regras gerais estabelecidas na legislação é bastante mais abrangente do que o estabelecido nas normas.



## Uma ferramenta de gestão de riscos

De forma geral, a rastreabilidade pode ser considerada como um processo dinâmico que permite conhecer a história do produto através da documentação gerada nas várias etapas. A boa implementação de um sistema de rastreabilidade no sector agro-alimentar pressupõe, para além do estabelecimento de uma boa relação de cordialidade e da transparência de informação entre todos os operadores, uma boa organização administrativa por parte das empresas e uma compreensão generalizada dos objectivos a atingir. Torna-se assim importante que os responsáveis definam primeiro qual a abrangência que pretendem dar ao sistema e depois se disponham a formar e investir nos meios para o fazer funcionar.

Por forma a evitar interpretações menos correctas do objectivo a alcançar pela legislação comunitária e pelas normas existentes torna-se importante esclarecer que a rastreabilidade apresenta-se como uma ferramenta de gestão de riscos, ou seja, por si só a rastreabilidade não melhora a segurança dos alimentos, no entanto permite, através duma comunicação mais efectiva, uma maior rapidez na localização dos produtos no caso dos vários tipos de incidentes:

- Incidente ao nível da segurança do produto (existe um perigo para a saúde do consumidor);
- Incidente legal (o produto não cumpre com um requisito legal, implicando ou não perigo para a saúde do consumidor);
- Incidente ao nível da qualidade (não existe perigo para a saúde do consumidor mas o produto não corresponde às suas expectativas por estar fora das especificações).

A esta classificação de incidente está associada a acção a ser tomada, podendo ir desde um bloqueio na distribuição do produto a uma recolha pública ao nível do consumidor. Deste modo, um incidente de segurança leva, de forma geral, a uma recolha de produto, um incidente legal conduz a um bloqueio e/ou recolha do produto e uma não-conformidade ao nível da qualidade conduz, na maioria dos casos, a um bloqueio do produto.

Relativamente à informação a reter, embora os elementos mínimos sejam o nome e endereço do fornecedor/cliente e a data de transacção, tem-se verificado uma adesão consensual à utilização do lote enquanto elemento básico de identificação.

O registo e a transmissão de dados poderão ser feitos de forma manual ou através de registo informático, com os consequentes benefícios e inconvenientes que se prendem com estes dois tipos de sistemas.

Um registo manual consiste em inscrever em formulários próprios (papel) todos os dados de informação inerentes ao sistema de rastreabilidade, pressupondo uma transmissão física da informação ao longo de todas as fases do processo, assim como um arquivo exclusivamente em papel. Um registo informático pressupõe a introdução e o fluxo de informação através de uma rede informática que pode ser mais ou menos complexa.

Para evitar a existência de informação desintegrada, que mais tarde dificulta a recolha em tempo útil dos dados necessários, deve existir uma linha condutora coerente ao longo das várias etapas, sugerindo-se o recurso a registos normalizados, nomeadamente códigos de barras ou outros específicos.

A fim de garantir a sua efectividade, torna-se necessário proceder à revisão periódica dos sistemas de rastreabilidade através de "exercícios" que simulem casos práticos adaptados à realidade da empresa. A frequência dos "exercícios de rastreabilidade" depende tanto da sensibilidade/perigosidade dos produtos em causa, como do grau de maturação/fiabilidade do sistema montado e do nível de formação dos operadores. O responsável pela execução do exercício deverá redigir e publicar um relatório, sendo que o mais importante será sempre o seguimento dado ao plano de acções correctivas resultante.

Embora os conceitos associados aos sistemas de rastreabilidade não sejam difíceis de interpretar, existe um largo número de questões práticas bastante complexas, pelo que a sua implementação deve atender, acima de tudo, à “nova” relação de confiança que a empresa deseja estabelecer com o mercado.

# EVALUATION OF THE VOLATILE COMPOSITION OF WHISKEYS BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

*Oliveira, L.; Rodrigues, F.; Perestrelo, R.; Caldeira, M.; Marques, J.C.; Câmara, J.S.\**

Centro de Química da Madeira, Departamento de Química da Universidade da Madeira, Campus  
Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal. Portugal.  
Tel: +351 291705112 Fax: +351 291705149 e-mail: [jsc@uma.pt](mailto:jsc@uma.pt)

**Keywords:** liquid-liquid extraction; solid-phase microextraction; volatile organic compounds; odour activity values; whisky

**Abstract:** The present work was carried out to evaluate the performance of two extraction methods (LLE and dynamic HS-SPME) in the determination of volatile compounds from commercial Scotch whiskeys. Seven different extraction solvents [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , H,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -DE (3:1 and 1:3),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -H (3:1 and 1:3) and DE-H 1:3] and two kinds of commercially available fibres: Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 75  $\mu\text{m}$ ), apolar, and polyacrilate (PA, 85  $\mu\text{m}$ ), quite polar, were used to determine the extraction efficiency of volatile compounds. The best solvent and SPME fibre were applied by employing GC with flame ionisation detector (FID) to the determination of absolute content of whiskeys volatiles. The selectivity of each method for specific classes of flavour compounds was evaluated. Linearity, detection and quantification limits, and precision of the whole analytical procedure have also been calculated.

## 1. INTRODUCTION

Analysis of flavour/aroma compounds is one of the most important steps in the evaluation of whisky quality. Being a combination of taste and olfaction senses, these characteristics are crucial factors in consumer acceptance of drinks and foods.

This great diversity of compounds are produced through metabolic pathways and their genesis depends on many factors related to raw materials and the subsequent processes of mashing, fermentation, distillation and ageing, others are oak derived, while others depend on the type of technological treatment. Many of these compounds are common to different whiskeys but differ analytically in terms of the relative amount. <sup>[1-5]</sup>

Given the lack of information about the whiskeys odour-active compounds, the levels of recognised odorants were used to establish exactly the flavour differences between the whiskeys, and to calculate the odour activity values in order to elucidate the most potent aroma compounds of the studied samples.

Ethyl esters are an essential family among the aroma components of whiskeys. Even present in small amounts, they have very intense odour characterised by pleasant aromas, such as *fruity* and *floral* aromas that generally contribute positively to the global quality of whiskeys [5]. The higher alcohols are also an important family, quantitatively and qualitatively speaking, being characterized by their *strong* and *pungent* smell and taste. Higher alcohol acetates are correlated with *freshness* and *fruitness* character, while fatty acids can contribute with *fruity*, *cheese*, *fatty* and *rancid* notes to the whiskeys sensory. However, not all compounds contribute to the same extent to whisky aroma. In fact, if the *concentration/olfactory* threshold ratio of each compound, known as the odour activity value (OAV) is  $\geq 1$ , this allows estimating the contribution of each compound to the whisky aroma.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Sample extraction conditions

#### 2.1.1. LLE method

To 50 ml of whisky sample, to which 250  $\mu$ L of octan-3-ol and 1ml of 4-methylpentan-2-ol, in hydro alcoholic solution (1:1, v/v) at 422 mg/l as internal standards were added, was poured into a 100 ml flask. 5 g of sodium sulphate was added. The samples were then extracted twice with 5 ml of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solution was stirred during 15 min at 400 rpm. Both organic phases obtained were blended and dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated to 500  $\mu$ l under a gentle stream of pure nitrogen (N45, Air Liquide, Portugal). Injection of the concentrated extract was made in split mode (split ratio, 1:10; sample size, 1  $\mu$ l) in the GC-FID, for quantification and onto GC-MS for volatile identification.

#### 2.1.2. Solid phase microextraction procedure

After adjust to 12-13% (v/v) alcohol by dilution with distilled water, whisky samples were adjusted to pH 3.3 and the ionic strength was increased, using NaCl (30%), to improve the extraction efficiency. A 60 ml vial containing 35 ml of sample, spiked with 0.422  $\mu$ g/l of octan-3-ol (Sigma-Aldrich) and 4-methylpentan-2-ol, which were used as internal standard (50  $\mu$ l of alcoholic solution at 422 mg/l), was placed in a thermostatic block on a stirrer. The fibre was then exposed to the gaseous phase during 60 min at temperature of  $40\pm 1^\circ\text{C}$ . As stirring usually improves the extraction, because the static layer resistant to mass transfer is destroyed (facilitate mass transport between the bulk of the aqueous sample and the fibre), all the experiments were performed under constant stirring velocity (1250 rpm). After extraction, the SPME fibre was withdrawn into the needle, removed from the vial and inserted into the hot injector port ( $240^\circ\text{C}$ ) of the GC-MS system for 6 min. where the extracted chemicals were desorbed thermally and transferred directly to the analytical column.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Identification of the main odorants

To estimate the sensory contribution of the volatiles to the overall flavour of whiskeys the OAV were calculated. However the ranking of the OAV were different because of differences in concentration levels. From all volatile quantified compounds, those present at concentrations higher than their odour threshold are mainly considered as aroma contributing substances. The results showed that, 14 out of 25 components (50%) quantified in the 9 commercial whiskeys were found at concentrations higher than their corresponding threshold values ( $\text{OAV}\geq 1$ ). According to the OAV, ethyl octanoate, a compound associated with *sweet*, *fruity* and *fresh* notes, was the most intense odorant in the studied samples. Isoamyl acetate was the next most significant compound with an OAV values that ranges from 92.72 (RL) to 190.52 (GRA). This compound contributed for the total aroma of the whiskeys, with a characteristic *banana-like* odour. With regard to alcohols, 3-methylbutan-1-ol (*fruity*) and 2-methylpropan-1-ol (*bitter*, *harsh*), were the only ones found contributing to whisky aroma. Propan-1-ol and  $\beta$ -phenylethanol, although exhibiting OAV lower than 1 also could contribute to the *floral* character of studied whiskeys. Ethyl hexanoate showing a *green apple* and *anise* aroma, was identified as another important aroma-active compounds in DW>BL>GRA>FG>BAL whiskeys. For HC, RL and LJ samples, this compound present an  $\text{OAV} < 0.1$ , and don't contributed to the aroma of these whiskeys. Hexanoic, octanoic and

decanoic acids exhibit an aroma index very high, indicating that these compounds contribute individually to the studied whiskeys aroma.

There is a similarity in the OAV between the different commercial whiskey samples. The most significant differences were observed for BL and GRA. The highest OAV values were gotten for by-products of the fermentative metabolism, such as: ethyl octanoate, isoamyl acetate and 2-methylpropan-1-ol. The volatile compounds that contribute less for the aromatic profile are propan-1-ol, butan-1-ol, hexan-1-ol, furfural and  $\beta$ -phenylethanol.

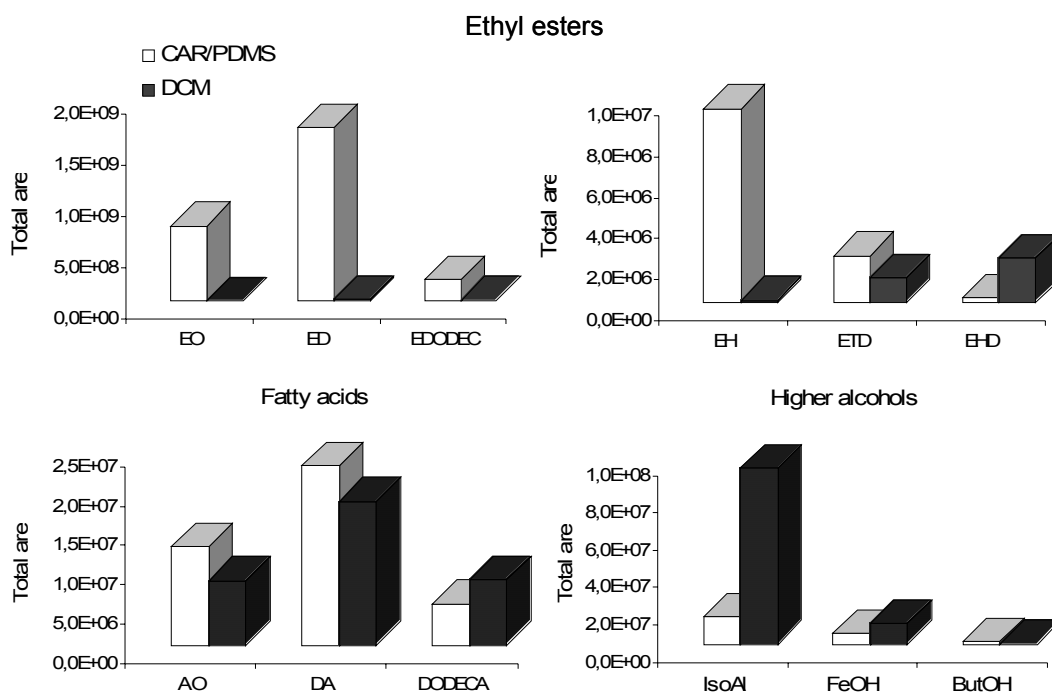


Fig. 1. Proportion of the chromatographic profile between  $LLE_{CH_2Cl_2}$  and  $SPME_{CAR/PDMS}$  methods for analysis of different chemical classes and specific compounds determined in BL whisky (DCM:  $CH_2Cl_2$ ; EO: ethyl octanoate; ED: ethyl decanoate; EDODEC: ethyl dodecanoate; EH: ethyl hexanoate; ETH: ethyl tetradecanoate; EHD: ethyl hexadecanoate; OA: octanoic acid; DA: decanoic acid; DODECA: dodecanoic acid; Isoalc: 3-methylbutan-1-ol; FeOH:  $\beta$ -phenylethanol; ButOH: butan-1-ol).

### 3.2. Whisky differentiation

The proposed  $LLE_{CH_2Cl_2}$  method was applied to nine different commercial whiskeys. Evidently, the different concentrations of the volatile constituents determined in these samples allow their differentiation. The obtained results were subjected to principal components analysis (PCA) which revealed that GRA, HC, LJ, and BL whiskeys were clearly separated in a two dimensional projection. The PCA results show that 81.29% for the obtained results can be represented in a subspace formed by two coordinates (principal components) constructed from linear combinations of the various concentrations that describe each volatile fraction. Fig. 8 shows how GRA whisky is clearly separated from the others. From the latest, LJ and BL are the most differentiated ones, followed by HC and DW. The BAL, FG and RL whiskeys are much closed that confirm that they have very similar compositions. The

compounds which contributed most to the differentiation were hexan-1-ol, 3-methylbutanoic acid and  $\beta$ -phenylethanol.

Factor 1 which signifies 67.78% of the information is constructed mainly from contribution of hexan-1-ol (0.97), 3-methylbutanoic acid (0.97), 3-methylbutan-1-ol acid (0.96) and 5-methylfurfural (0.96). Factor 2 correspond to 13.5 % of the information and consist mainly of  $\beta$ -phenylethanol (0.96) and isoamyl acetate (0.90).

For a complete and quantitative study of volatile composition in food beverages, two or more sample preparation techniques are recommended. Volatile compounds of whiskeys extracted using the two methods LLE and SPME were identified by GC-MS. 25 of them were quantified by GC-FID, and their odour-active compounds identified. HS-SPME<sub>CAR/PDMS</sub> provides a more sensitive technique to the traditional method of LLE. Sixty-five volatile organic compounds were identified using HS-SPME<sub>CAR/PDMS</sub> applied to the extraction of BL whisky, whereas only 55 aroma compounds were identified using traditional LLE. The main advantages of LLE compared to other conventional methods are that is simple, rapid and no specific instrumentation was required. The LLE<sub>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></sub>-GC-FID analysis revealed that volatile fractions of the studied whiskeys were very rich in ethyl esters followed by higher alcohols and fatty acids.

The identification of whisky aroma compounds and the determination of analytical ratio combined with statistics provide efficient tools like: differentiation of whiskies, establishing criteria for genuineness, improvement of quality, prevention of frauds and guaranteeing their origin.

## REFERENCES

- [1] G. Fitzgerald, K.J. James, K. MacNamara, M.A. Stack, J. Chromatogr. A 896 (2000) 351.
- [2] W. Wardencki, P. Sowinski. J. Curylo, J. Chromatogr. A 984 (2003) 89.
- [3] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, J. Chromatogr. A 966 (2002) 166.
- [4] V. Ferreira, N.Ortin, A. Escudero, R. Lopez, J. Cacho, J. Agri. Food Chem. 50 (2002) 4048.
- [5] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V Ferreira, J. Chromatogr. A 966 (2002) 166.
- [6] J.S. Câmara, P. Herbert, J.C. Marques, M.A Alves, Anal. Chimica Acta 513 (2004) 203.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the Famous Grouse Company Scotland) and Prime Drinks, Lda. (Portugal) for the supply of the samples used in this study.

# ÍNDICE CRIOSCÓPICO DO LEITE. ASPECTOS A CONSIDERAR NA ANÁLISE DO SEU SIGNIFICADO

Calhau, L.; Duthoit, M. e Ravasco, F.

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI), Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares (DTIA), Estrada do Paço do Lumiar, nº 22, 1649-038 Lisboa  
Tel +351-217127109 Fax +351-217127162 e-mail [luisa.calhau@mail2.ineti.pt](mailto:luisa.calhau@mail2.ineti.pt)

**Palavras chave:** Índice crioscópico, leite, fraudes, tratamento térmico, armazenagem

**Resumo:** A determinação do Índice Crioscópico (IC) do leite é efectuada com o objectivo de avaliar se o leite sofreu ou não adição de água. O Regulamento CE nº 2597/97, Artº 4º alínea a) especifica que “o leite de consumo deve ... ter um ponto de congelação próximo do ponto de congelação médio determinado para o leite cru na zona de origem da recolha”. Neste *item*, há naturalmente um hiato entre a legislação e a qualidade da informação disponibilizada pelo resultado do IC, nomeadamente:

a) ainda não estão definidas, a partir de análises discriminatórias, as zonas de produção e respectivo IC;

b) o termo “próximo” é vago e deverá estar definida a incerteza associada aos métodos e a variabilidade da população (por amostragem) da(s) zona(s) de produção.

Há, no entanto, que conhecer a forma como outros factores afectam esta determinação para que os valores obtidos no IC tenham um significado mais exacto. Neste estudo, utilizou-se o crioscópio *The Advanced Cryoscope 4D3* e determinou-se a incerteza associada ao método e o seu limite de detecção. Estudou-se ainda o modelo da relação entre o teor de água adicionado e a depressão crioscópica obtida, para leite pasteurizado e leite ultrapasteurizado (UHT). Avaliou-se também a influência no valor de IC de factores como o tratamento térmico, a acidez e o tempo de armazenagem. Verificou-se que alguns dos parâmetros considerados, influenciam de forma significativa os resultados do IC, pelo que devem ser tidos em conta quando se analisa o seu significado.

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação do ponto de congelação do leite, também denominada de determinação do Índice Crioscópico (IC), é uma análise vulgarmente efectuada no controlo de qualidade deste produto, de forma a avaliar a possível adição de água ao leite. Esta adulteração pode ter uma origem meramente accidental ou involuntária, devido por exemplo a uma secagem deficiente das cubas de recolha do leite, ou uma origem deliberada e fraudulenta, praticada por razões económicas, estando desta forma sujeita a sanções. Ambas as situações devem, no entanto, ser detectadas e devidamente analisadas, não só pelas razões económicas apontadas, mas também por poderem ser causadoras de alterações organolépticas no leite e/ou contaminações bacteriológicas.

A depressão crioscópica é uma propriedade coligativa das soluções e por isso depende do número de moléculas presentes em solução e não da sua dimensão. Desta forma, os constituintes do leite que mais contribuem para o abaixamento do ponto crioscópico são a lactose e os sais minerais. A adição de água ao leite vai diminuir a concentração destes constituintes e aumentar o IC. De uma forma genérica, os leites de grande mistura de uma dada zona de produção têm um IC bastante estável e por isso a sua determinação pode ser utilizada para determinar se houve adição de água e em que extensão. O valor do IC para as várias espécies produtoras é variável uma vez que o teor em sólidos solúveis também varia. Para uma dada espécie, o valor mantém-se constante para leites de grande mistura, oriundos de uma determinada região. Este estudo compreendeu apenas amostras de leite de vaca e, salvo se não for explicitamente dito, é sempre a esta espécie que se referem os resultados.

Em termos analíticos, existe uma Norma Internacional (IDF 108) [1] para a determinação do Índice Crioscópico, que se baseia na medida do ponto de congelação do leite através da utilização de um

crioscópio. O funcionamento deste aparelho baseia-se na congelação rápida da amostra, provocada por um abaixamento brusco da temperatura (alguns graus abaixo do seu ponto de congelação), o que originará uma libertação de calor (correspondente ao calor de fusão) que, por sua vez, vai causar um aumento da temperatura da amostra de leite, até se atingir o seu ponto de equilíbrio sólido/líquido, ou seja, até se atingir o ponto de congelação [2].

Contudo, quando se pretende efectuar uma comparação dos resultados de IC, obtidos para diferentes amostras, ou efectuar uma avaliação conclusiva acerca da adição ou não de água ao leite, a tarefa pode tornar-se bastante delicada, uma vez que este parâmetro depende de todos os factores que influenciam directa ou indirectamente o teor de sólidos solúveis no leite. Assim, para além da adição de água, factores como a raça, origem, estação do ano, alimentação e consumo de água pelo animal, período do dia em que a ordenha é realizada, clima, mastites, tratamento térmico e tempo de armazenagem do leite, acidez, etc. poderão interferir nos valores de IC obtidos [3]. Por exemplo, um leite acidificado tem um IC menor que teria no seu estado fresco, uma vez que a acidificação corresponde a um desdobramento de uma molécula de lactose em duas moléculas de ácido láctico. Este aspecto é referido na bibliografia [4] e a norma de referência dá a indicação que, para um “leite fresco”, o IC só deve ser determinado em amostras com valor de acidez inferior a 20 cm<sup>3</sup> de NaOH 1N /dm<sup>3</sup> de leite.

No caso dos leites UHT, a legislação [5] prevê que o seu IC se aproxime do IC da matéria prima que lhe deu origem. A mesma legislação indica que o valor do IC para o leite cru deve ser determinado para os leites de mistura da região de recolha. Em Portugal estes dados não estão disponibilizados e por isso a interpretação do IC é sempre deficitária neste valor.

O aumento dos valores do IC nos leites UHT pode reflectir, não uma adição fraudulenta de água, mas uma possível remoção incompleta da mesma, após a injeção de vapor, operação que faz parte da tecnologia de produção deste leite.

A bibliografia referente a factores que influenciam o IC é bastante escassa. Sendo até agora o IC o parâmetro mais consensual quanto ao despiste da possível adição de água ao leite, é primordial um estudo mais aprofundado, por forma a fazer um juízo mais preciso das variações nos valores do IC determinados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras e análises efectuadas

Foram analisadas 16 amostras de leite UHT de seis marcas distintas, provenientes de diferentes zonas de recolha e com diferentes teores butirosos (leite magro, leite meio-gordo e leite gordo).

Foram ainda analisadas 5 amostras de leite pasteurizado, também com diferentes teores butirosos, de duas marcas distintas, obtidas igualmente no comércio retalhista. Algumas das marcas recolhidas não comercializam os três níveis de gordura, pelo que não foi possível obter um desenho factorial completo.

Na tabela 1 apresenta-se uma descrição das amostras analisadas, quanto ao seu tratamento térmico, marca e teor butiroso.

**Tabela 1 – Agrupamento das amostras por tratamento térmico, marca e teor butiroso**

|                     |         | Magro | Meio Gordo | Gordo |
|---------------------|---------|-------|------------|-------|
| <b>UHT</b>          | Marca A | x     | x          | x     |
|                     | Marca B | x     | x          | x     |
|                     | Marca C | x     | x          | x     |
|                     | Marca D | x     | x          | x     |
|                     | Marca E | x     | x          | -     |
|                     | Marca F | -     | x          | x     |
| <b>Pasteurizado</b> | Marca G | -     | x          | x     |
|                     | Marca H | x     | x          | x     |

“x” amostras analisadas

“-” amostras não analisadas (por não serem produzidas ou ausência no mercado)

A partir de cada amostra de leite UHT, foram constituídas mais duas amostras, cada uma com 10% de água adicionada, proveniente de dois locais de abastecimento distintos: água da rede pública e água



para laboratório Tipo II ASTM, de forma a avaliar a influência do tipo de água adicionada no valor do IC.

Para verificar a relação entre a quantidade de água adicionada e o aumento do IC, foram adicionadas, a cada amostra de leite, quantidades de água da rede que oscilaram entre 0,5% e 10% (num total de 80 amostras).

Por último, para avaliar a influência da armazenagem no valor do IC, analisaram-se as amostras de leite UHT, na data de durabilidade mínima, indicada nas próprias embalagens.

Na tabela 2 apresenta-se um esquema das amostras constituídas e dos parâmetros analisados para cada uma delas.

**Tabela 2 - Amostras constituídas e parâmetros analisados**

|  | IC | Acidez | Resíduo seco |
|--|----|--------|--------------|
| (16) Leite UHT   | x  | x      | x            |
| (16) Leites UHT c/ adição de água Tipo II ASTM (10% v/v)           | x  | -      | -            |
| (80) Leites UHT c/ água da rede (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10% v/v)     | x  | -      | -            |
| (16) Leite UHT após armazenagem                                    | x  | x      | -            |
| (5) Leite pasteurizado   | x  | x      | -            |
| (25) Leite Pasteur. c/ água da rede (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10% v/v) | x  | -      | -            |

“(n)” número de amostras constituídas em cada grupo

“x” parâmetro determinado

“-” parâmetro não determinado

O IC foi determinado com base na norma IDF 108 (2002) [1], tendo-se feito ensaios em duplicado para todas as amostras analisadas.

A acidez foi determinada segundo a Norma Portuguesa NP 470 [6].

O resíduo seco foi determinado segundo a Norma Portuguesa NP 475 [7].

### Equipamento

Utilizou-se um crioscópio da *Advanced Instruments, Inc.*, modelo 4D3. O crioscópio foi calibrado com duas soluções de referência correspondentes a um IC de  $-0,408^{\circ}\text{C}$  e  $-0,600^{\circ}\text{C}$ . A calibração foi regularmente verificada com uma solução de referência de IC igual a  $-0,512^{\circ}\text{C}$ .

### Análise estatística

Na análise dos resultados obtidos neste estudo aplicaram-se várias ferramentas estatísticas, tais como a estatística descritiva, a regressão linear, a comparação de valores emparelhados e a ANOVA com um factor.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por forma a poder analisar a qualidade dos resultados obtidos, estimou-se a incerteza associada ao método. O valor determinado para a incerteza expandida, com grau de probabilidade de 95% ( $0,00180^{\circ}\text{C}$ ), foi arredondado à milésima superior obtendo-se um valor final de  $\pm 0,002^{\circ}\text{C}$ .

A repetibilidade do método obtida pelo laboratório é de  $0,002^{\circ}\text{C}$ .

Na Tabela 3 apresenta-se o conjunto dos resultados obtidos, para as amostras em estudo e para todos os parâmetros considerados. Os valores de IC correspondem à média dos duplicados.

**Tabela 3 – Resultados do IC, Resíduo Seco e Acidez para as amostras em estudo**

| Marca | Teor butiroso | IC     | IC c/ Adição de água da rede |         |        |        |         | Água II | Resíduo Seco | Acid. | IC +3M | Acid. +3M |
|-------|---------------|--------|------------------------------|---------|--------|--------|---------|---------|--------------|-------|--------|-----------|
|       |               |        | 0,5%                         | 1,0%    | 2,5%   | 5,0%   | 10,0%   | 10,0%   |              |       |        |           |
| A     | Magro         | -0,510 | -0,505                       | -0,502  | -0,497 | -0,481 | -0,456  | -0,453  | 8,5          | 19    | -0,507 | 20        |
|       | M/gordo       | -0,517 | -0,516                       | -0,510  | -0,503 | -0,488 | -0,459  | -0,459  | 10,0         | 19    | -0,516 | 19        |
|       | Gordo         | -0,510 | -0,509                       | -0,503  | -0,495 | -0,483 | -0,456  | -0,454  | 11,8         | 19    | -0,511 | 20        |
| B     | Magro         | -0,517 | -0,517                       | -0,512  | -0,503 | -0,490 | -0,467  | -0,462  | 8,9          | 19    | -0,519 | 19        |
|       | M/gordo       | -0,513 | -0,510                       | -0,509  | -0,501 | -0,487 | -0,461  | -0,458  | 10,3         | 19    | -0,515 | 20        |
|       | Gordo         | -0,520 | -0,515                       | -0,513  | -0,506 | -0,490 | -0,465  | -0,461  | 11,9         | 19    | -0,520 | 19        |
| C     | Magro         | -0,513 | -0,510                       | -0,508  | -0,500 | -0,486 | -0,460  | -0,459  | 9,0          | 18    | -0,515 | 19        |
|       | M/gordo       | -0,515 | -0,509                       | -0,505  | -0,500 | -0,485 | -0,461  | -0,458  | 10,3         | 18    | -0,517 | 20        |
|       | Gordo         | -0,516 | -0,514                       | -0,511  | -0,505 | -0,489 | -0,461  | -0,458  | 12,0         | 20    | -0,516 | 21        |
| D     | Magro         | -0,506 | -0,501                       | -0,499  | -0,492 | -0,478 | -0,454  | -0,452  | 8,5          | 19    | -0,509 | 22        |
|       | M/gordo       | -0,510 | -0,507                       | -0,505  | -0,496 | -0,483 | -0,456  | -0,455  | 10,1         | 21    | -0,511 | 22        |
|       | Gordo         | -0,509 | -0,507                       | -0,505  | -0,492 | -0,479 | -0,452  | -0,452  | 12,1         | 20    | -0,511 | 21        |
| E     | Magro         | -0,515 | -0,510                       | -0,510  | -0,503 | -0,489 | -0,466  | -0,460  | 9,0          | 19    | -0,518 | 20        |
|       | M/gordo       | -0,519 | -0,516                       | -0,515  | -0,505 | -0,491 | -0,467  | -0,464  | 10,5         | 20    | -0,525 | 22        |
| F     | M/gordo       | -0,515 | -0,512                       | -0,510  | -0,500 | -0,487 | -0,460  | -0,458  | 10,5         | 19    | -0,514 | 20        |
|       | Gordo         | -0,516 | -0,514                       | -0,510  | -0,503 | -0,488 | -0,460  | -0,460  | 12,2         | 19    | -0,518 | 20        |
| G     | M/            | -0,516 | -0,518                       | -0,514  | -0,507 | -0,489 | -0,4655 | -0,466  | 10,5         | 18    | -      | -         |
|       | Gordo         | -0,522 | -0,519                       | -0,516  | -0,508 | -0,490 | -0,464  | -0,463  | 12,2         | 19    | -      | -         |
| H     | Magro         | -0,515 | -0,512                       | -0,5115 | -0,505 | -0,490 | -0,461  | -0,464  | 9,4          | 19    | -      | -         |
|       | M/            | -0,517 | -0,515                       | -0,514  | -0,503 | -0,490 | -0,460  | -0,465  | 10,5         | 19    | -      | -         |
|       | Gordo         | -0,517 | -0,515                       | -0,510  | -0,502 | -0,489 | -0,462  | -0,461  | 12,2         | 19    | -      | -         |

IC expresso em °C, Acidez expressa em cm<sup>3</sup> de NaOHNd<sup>-3</sup>, Resíduo Seco expresso em % (m/m)

Fez-se uma comparação de valores emparelhados para as amostras adicionadas de água tipo II e água da rede pública. Verificou-se que a diferença é significativa (tabela 4), embora a média da diferença entre os pares seja inferior à incerteza do método. O mesmo se verificou para a comparação entre as amostras após recolha e após armazenagem durante 3 meses (tabela 4). A diferença entre médias é de cerca de 0,001°C, valor inferior à incerteza e à repetibilidade do método.

**Tabela 4 – Comparação do IC em leite adicionado de água tipo II e água da rede pública e comparação de IC em amostras após recolha e na data de durabilidade mínima**

|                                   | Água da rede | Água tipo II | Tempo 0     | Após armazenagem |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|------------------|
| Média                             | -0.460595238 | -0.459119048 | -0.5135625  | -0.514875        |
| Variância                         | 1.76155E-05  | 1.71476E-05  | 1.59958E-05 | 1.97167E-05      |
| Observações                       | 21           | 21           | 16          | 16               |
| Corr. Pearson                     | 0.821381881  |              | 0.904232862 |                  |
| Hipótese p/a a diferença da média | 0            |              | 0           |                  |
| df                                | 20           |              | 15          |                  |
| t Stat                            | -2.714186288 |              | 2.768595613 |                  |
| P(T<=t) one-tail                  | 0.006678257  |              | 0.007169665 |                  |
| t crítico one-tail                | 1.724718218  |              | 1.753050325 |                  |
| P(T<=t) two-tail                  | 0.013356514  |              | 0.014339331 |                  |
| t crítico two-tail                | 2.085963441  |              | 2.131449536 |                  |

A prossecução do trabalho foi feita com água da rede pública, por ser aquela que mais se aproxima da água adicionada, em eventuais actos fraudulentos.

Fez-se uma análise de variância com um factor para a Matéria Gorda e a Marca. A ANOVA factorial que nos permitiria obter a interacção destes dois factores não foi possível ser aplicada, dadas as lacunas no desenho inicial (ver ponto “Amostras e análises efectuadas”).

Verificou-se que o teor butiroso não influencia significativamente o valor de IC (Tabela 6). Esta situação já era esperada [8], uma vez que o IC é uma propriedade coligativa e só depende das espécies solúveis, o que não acontece com a matéria gordosa que se encontra em emulsão. No entanto, foi um parâmetro considerado para este estudo já que a presença de gordura poderia intervir na condução térmica no processo de medição com a sonda.

**Tabela 5 – ANOVA, Matéria Gorda**

| Source of Variation | SS          | df | MS          | F           | P-value     | F crit      |
|---------------------|-------------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Entre grupos        | 1.90292E-05 | 2  | 9.51458E-06 | 0.559913614 | 0.584441171 | 3.805565253 |
| Dentro do grupo     | 0.000220908 | 13 | 1.69929E-05 |             |             |             |
| Total               | 0.000239938 | 15 |             |             |             |             |

A marca tem um efeito significativo nos valores de IC (Tabela 6). Este facto pode dever-se a dois aspectos. A matéria prima é de zonas de produção particularmente distintas ou a produção do leite UHT não foi igualmente eficaz na remoção da água proveniente do vapor injectado.

**Tabela 6 – ANOVA, Marcas**

| Variacão        | SS          | df | MS          | F           | P-value    | F crit      |
|-----------------|-------------|----|-------------|-------------|------------|-------------|
| Entre grupos    | 0.000157354 | 5  | 3.14708E-05 | 3.810797175 | 0.03418425 | 3.325834529 |
| Dentro do grupo | 8.25833E-05 | 10 | 8.25833E-06 |             |            |             |
| Total           | 0.000239938 | 15 |             |             |            |             |

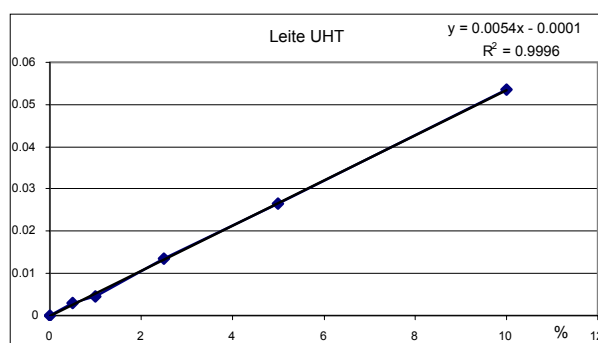
Fez-se uma comparação de valores emparelhados para as amostras tal e qual e as amostras adicionadas de 0,5% de água. Para todas as amostras, a adição de água correspondeu a um aumento do valor do IC. Pela análise dos valores emparelhados (Tabela 7), verificou-se que a diferença entre eles foi, em média de 0,003°C, que é significativa.

**Tabela 7 – Comparação do IC para leite s/ adição, com 0,5% e com 2,5% de adição de água**

|                                   | s/ adição    | c/ 0,5 %     | s/ adição    | c/ 2,5 %    |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Média                             | -0.514380952 | -0.511666667 | -0.514380952 | -0.50097619 |
| Variância                         | 1.56476E-05  | 2.22333E-05  | 1.56476E-05  | 2.11369E-05 |
| Observações                       | 21           | 21           | 21           | 21          |
| Corr. Pearson                     | 0.909864554  |              | 0.927044276  |             |
| Hipótese p/a a diferença da média | 0            |              | 0            |             |
| df                                | 20           |              | 20           |             |
| t Stat                            | -6.266953434 |              | -35.08486245 |             |
| P(T<=t) one-tail                  | 2.02479E-06  |              | 9.68405E-20  |             |
| t crítico one-tail                | 1.724718218  |              | 1.724718218  |             |
| P(T<=t) two-tail                  | 4.04958E-06  |              | 1.93681E-19  |             |
| t crítico two-tail                | 2.085963441  |              | 2.085963441  |             |

No entanto, dado o valor da dispersão de resultados para as amostras em estudo, não adicionadas de água (para os leites UHT a média dos resultados foi de -0,514°C com um desvio padrão de 0,004°C), e o valor da incerteza associada ao método, esta diferença não é de molde a permitir detectar uma adição de água a este nível. O mesmo se verifica para a adição de 1% de água. A detecção inequívoca de adição de água só é verificada para valores iguais ou superiores a 2,5% (média das diferenças de 0,013°C).

Verificou-se haver uma relação proporcionalmente directa, até ao valor estudado de 10%, entre o valor de água adicionada e a variação do valor do IC (figura 1). Esta relação directa verifica-se para os leites UHT e Pasteurizados com valores de coeficiente de regressão entre 0,9921 e 0,9996.



**Figura 1 - Relação entre IC e volume de água adicionado, para um leite UHT**

Assim, o IC é uma determinação válida não só na detecção da eventual água adicionada como também permite, entre determinados limites, quantificar o volume dessa adição.

#### 4. CONCLUSÕES

Para os leites UHT em estudo, o valor de IC é influenciado pela marca (Origem da Matéria prima/Tecnologia), mas não pelo teor butíroso. O valor do IC permanece praticamente inalterado até à data de durabilidade mínima.

Para o caso do leite UHT e pasteurizado, o método tem capacidade para detectar adições de água a partir dos 2,5%, uma vez determinado o valor de referência para o leite em causa.

Seria de todo o interesse a determinação do IC dos leites crus de vaca recolhidos no país. Considerando áreas de recolha bem definidas e leites de grande mistura, esperar-se-á obter valores de IC num intervalo ainda mais apertado que aquele obtido neste estudo o que permitirá uma eventual diminuição do valor a partir do qual a fraude é inequivocamente detectada.

Por outro lado, seria do maior interesse comparar os valores de IC para os leites crus e para os leites pasteurizados e UHT produzidos a partir destes.

#### Referências

- [1] – International standard ISO5764/IDF108 – *Milk – Determination of freezing point – thermistor cryoscope method (Reference method)* (2002)
- [2] – P. Chen, X. D. Chen, K. W. Free – *Measurement and data interpretation of freezing point depression of milks* J. Food Engineering **30** (1996) 239-253
- [3] – A. C. Almeida, G. L. M. Silva, D. B. Silva, Y. M. Fonseca, T. T. M. Buelta, E. C. Fernandes, – *Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas*, R. Un. Alfenas, Alfenas, 5:165-168 (1999)
- [4] – C.P. Pappas, L.P. outsinas, E. Kondyli – *Determination of added water in sheep milk by measurements of the freezing point and acidity*, Milkwissenschaft **49** (6) (1994) 309-312
- [5] – Regulamento (E) n°2597/97 do Conselho de 18 de Dezembro de 1997 *que estabelece as regras complementares da organização comum de mercado no sector do leite e dos produtos lácteos no que diz respeito ao leite de consumo* J. O. C. E. (1997)
- [6] – NP 470 - Leites. Determinação da Acidez (1983)
- [7] – NP 475 - Leites. Determinação do Resíduo Seco e Resíduo seco isento de Matéria Gorda (1983)
- [8] – B. A. Slaghuis – *The freezing point of authentic and original farm bulk tank milk in The Netherlands*, Int. Dairy J. **11** (2001) 121-126

## ANÁLISE DE TRICLOROANISOL EM CONTROLO DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE ROLHAS DE CHAMPANHE

*Dias<sup>1,2</sup>, J.A.F.; Bronze<sup>3,4,5</sup>, M.R.; San Romão<sup>4,5,6</sup>, M.V.; Vilas Boas<sup>4,7</sup>, L.*

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

<sup>2</sup> Relvas II, Rolhas de Champanhe SA, Vale do Cerejo, 7050-636 Cortiçadas do Lavre, Montemor-o-Novo

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa

<sup>4</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica-Universidade Nova de Lisboa, Apartado 127, 2784-505 Oeiras

<sup>5</sup> Instituto Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras

<sup>6</sup> Estação Vitivinícola Nacional (INIAP), 2565-191 Dois Portos

<sup>7</sup> Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa

As rolhas com maior utilização no engarrafamento de vinhos de Champanhe e vinhos espumantes são as rolhas compostas, ou técnicas, constituídas por um corpo cilíndrico de aglomerado misto e dois discos de cortiça natural colados na extremidade, os quais ficam em contacto com o líquido.

A existência de aromas estranhos no vinho, devido às rolhas (“gosto a rolha”) faz com que seja estimado que cerca de 0,1 a 10% dos vinhos em geral sejam anualmente rejeitados. Vários autores têm estudado estas alterações de gosto nos vinhos, existindo há mais de um século publicações sobre o tema.

No controlo de qualidade das rolhas, são efectuados testes físicos, avaliação sensorial e análises químicas em que se destaca a análise de compostos organo-halogenados. O 2,4,6-tricloroanisol é considerado um dos principais responsáveis pelo gosto a rolha pois tem um limiar olfativo muito baixo (da ordem das partes por trilião) e ocorre na maioria dos casos em que há rolhas com este defeito.

As análises de tricloroanisol são geralmente feitas usando microextração em fase sólida (SPME) e mediante cromatografia em fase gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa (MS): uma montagem conveniente é um sistema SPME-GC-MS com amostrador automático.

Analisaram-se amostras diversas: rolhas (extracto feito em vinho), discos e granulados (extracto feito em solução hidroalcoólica) e águas de cozedura de pranchas de cortiça.

Além da informação acerca dos produtos, os resultados das análises aqui discutidos contribuem para decisões relativas à adopção de medidas preventivas destinadas a evitar contaminações ao longo do processo desde as matérias primas até ao utilizador final.

Serão discutidos os ensaios necessários para garantir a qualificação dos equipamentos e o controlo de qualidade dos resultados das análises.

## ANALYSIS OF CONVENTIONAL AND AROMATIZED COFFEE SAMPLES BY SPME-GC-MS

*Santos<sup>1</sup>, L.H.L.M.; Pinho<sup>1,2</sup>, O.; Ferreira<sup>1\*</sup>, I.M.P.L.V.O.*

<sup>1</sup>REQUIMTE- Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Anibal Cunha 164, 4099-030 Porto; Portugal

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal  
isabel.ferreira@ff.up.pt

Coffee is a beverage of major social and economic importance. The two major species of coffee, *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta*, differ considerably in price, quality, volatile profile and consumer acceptance. Therefore preferred flavour for coffee is obtained by blending the varieties. Due to its unique aroma and flavor, considerable research has been carried out in the analysis of flavor related compounds in coffee.

Recently, a brand-new line of aromatized coffee, mixed the aroma and the scent of vanilla, caramel, almond liquor and irish cream not only to offer the connoisseurs a new fragrance but also give the coffee a new and the most pleasant form of expression.

Researchers on volatile flavor compounds have used several different techniques, all mainly based in the isolation and further identification of the peaks obtained by GC-MS.

A simple and sensitive method for the analysis of coffee volatile compounds was optimised using headspace solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography with mass detection. Headspace SPME using a 75 µm Carboxen-PDMS fiber provided effective sample enrichment and enabled extraction of a wide variety of compounds belonging to very heterogeneous groups, such as, esters, alcohols, acids, aldehydes, ketones, hydrocarbons, sulphur compounds, alicyclic compounds, aromatic compounds, heterocyclic compounds, etc. The SPME fiber, adsorption and desorption parameters were chosen to obtain the maximum sensitivity for the greater number of compounds. As observed coffee contain different volatile compounds profile depending of coffee specie, blend and addition of aromas. The optimised methodology was used to compare volatile profile from an arabica, a blend and four aromatized coffee samples. Some volatile compounds were simultaneously present in the six samples. However, the total number of volatile compounds and the profile was different, 131, 84, 109, 120, 77 and 62 volatiles for arabica, blend, vanilla, caramel, almond liquor and irish cream coffee samples, respectively.

# AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE ADN DE PRODUTOS DE SOJA PARA A DETECÇÃO DE OGM

*Mafra, I., \* Silva, S.A. e Oliveira, M.B.P.P.*

REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto,  
Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto

Tel +351-222 078 902 Fax +351-222 003 977 e-mail: [isabel.mafra@ff.up.pt](mailto:isabel.mafra@ff.up.pt)

**Palavras-chave:** soja, extracção de ADN, PCR, OGM

**Resumo:** A necessidade de monitorizar e verificar a presença de ingredientes ou produtos derivados de OGMs exige métodos analíticos capazes de detectar, identificar e quantificar o ADN introduzido ou as proteínas expressas. Os métodos analíticos baseados no ADN, nomeadamente a reacção em cadeia da polimerase (PCR), têm mostrado ser os mais promissores por serem extremamente sensíveis e específicos, por não dependerem da expressão de novas proteínas e pelo facto do ADN ser mais estável a elevadas temperaturas do que as proteínas. No entanto, o sucesso da aplicação da PCR na detecção de OGMs depende da quantidade, pureza e integridade do ADN isolado. A preparação e extracção de ADN da amostra são, por isso, passos críticos para a análise subsequente.

Pretendeu-se com este estudo avaliar quatro métodos de extracção de ADN de produtos derivados da soja. Para tal, extraíram-se 42 produtos de soja com cada um dos métodos, determinou-se a concentração de ADN, pureza e avaliou-se o nível de amplificação por PCR do gene da lectina da soja. Os resultados mostraram que os extractos de farinhas e proteínas isoladas da soja obtidos com os kits comerciais Nucleospin e Genespin permitiram obter os rendimentos mais elevados de ADN. O método CTAB levou, em geral, a rendimentos médios ou baixos, mas foi o método que permitiu o maior número de amplificações por PCR (33 amostras). O método Wizard apresentou rendimentos de ADN mais elevados do que os outros três métodos para alguns produtos muito processados (sobremesas de soja e vários pré-cozinhados de soja). Os métodos Nucleospin e Genespin não se mostraram adequados para as bebidas de soja uma vez que não se obteve ADN amplificável, contrariamente aos outros quatro métodos. Não foi possível obter ADN amplificável a partir de quatro molhos de soja com nenhum dos métodos de extracção. Por último, todos os métodos se mostraram adequados para amplificação por PCR em tempo real com o corante SYBR Green I.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas (GM) para a expressão de novas características, têm-se levantado diversas questões quanto ao impacto ambiental e segurança do fornecimento de alimentos no mercado internacional. Nomeadamente, a soja é a principal cultura GM produzida mundialmente, com 54,4 milhões de hectares plantados em 2005, o que corresponde a 60% da sua produção global [1].

Os métodos de análise de alimentos baseados no ADN por meio da reacção em cadeia da polimerase (PCR) têm-se tornado cada vez mais aplicados na identificação de OGMs, tendo também mostrado elevado potencial na detecção de ingredientes alimentares alergénicos ou fraudulentos [2]. O processo de isolamento de ADN dos alimentos é uma parte importante destes métodos uma vez que afecta largamente a qualidade dos resultados finais. Os métodos de isolamento deverão fornecer ADN de elevada qualidade e quantidade, o que significa que deverão minimizar a fragmentação do ADN a ser amplificado por técnicas de PCR e, para além disso, o extracto não deverá conter compostos inibidores da polimerase. Estes requisitos

têm-se atingido pela utilização de métodos avançados de extracção, dos quais se destaca o método baseado na solubilização em hexadeciltrimetilamónio (CTAB) com subsequente extracção líquido-líquido, aceite como um método “muito bom” [3, 4]. No entanto, este método é considerado trabalhoso e moroso, pelo que a disponibilidade no mercado de kits de extracção provenientes de vários fornecedores é muitas vezes uma alternativa mais rápida e prática.

A obtenção de extractos de ADN de elevada qualidade a partir de sementes, grãos ou material vegetal fresco apresenta dificuldades devido à co-purificação de polissacarídeos e polifenóis, os quais são potentes inibidores da PCR. Os alimentos processados e os ingredientes alimentares com elevado grau de refinação apresentam problemas adicionais. Os processos físicos e químicos a que os alimentos são sujeitos podem degradar o ADN por depurinação, “cross-linking” e hidrólise [5]. Assim, a amplificação de ADN degradado poderá ser reduzida ou falhar completamente, reduzindo efectivamente a sensibilidade do método ou levando à não detecção da sequência alvo.

Os alimentos contendo soja ou obtidos a partir da soja apresentam-se actualmente com uma grande diversidade de produtos, especialmente destinados a uma alimentação vegetariana. Desde a farinha de soja, proteína desidratada para substituição total ou parcial de carne, bebidas, sobremesas, tofu, etc., a gama de produtos já disponíveis, não apenas nas lojas de especialidade mas também nos supermercados e grandes superfícies, é já considerável. Pelo que, a detecção de soja GM em alimentos exige o desenvolvimento de métodos de extracção adequados aos diversos tipos de matrizes.

Pretendeu-se com este trabalho aplicar e avaliar quatro métodos de extracção de ADN de produtos à base ou contendo soja quanto ao rendimento, qualidade e amplificação do ADN obtido.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

As amostras analisadas incluíram soja em grão (3 amostras fornecidas por uma indústria e 2 adquiridas no comércio local), uma amostra de farinha de soja adquirida comercialmente, proteína de soja desidratada (7 amostras), bebidas de soja (8 amostras), molhos de soja (4 amostras), tofu (5 amostras), sobremesas de soja (6 amostras) e produtos contendo soja ou tofu pré-cozinhados (hambúrgueres, mortadela vegetal, salsichas de soja e chouriço de soja) (6 amostras).

Com excepção da farinha, bebidas, sobremesas e molhos, todas as amostras foram trituradas e homogeneizadas em moinho eléctrico.

### **2.2 Extracção de ADN**

O ADN foi extraído e purificado utilizando quatro métodos diferentes. Um método baseado no reagente CTAB, conforme descrito por Mafra et al. [6], dois métodos utilizando os kits comerciais Nucleospin (Macherey-Nagel) e GeneSpin (GeneScan Europe) e um método baseado na utilização parcial do kit Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps (Promega) conforme descrito por Lipp et al. [7].

### **2.3 Determinação da concentração e pureza do ADN**

A concentração de ADN nos extractos foi determinada por medição da absorvência a 260 nm ( $A_{260}$ ). A pureza do ADN foi obtida pela medição da absorvência a 280 nm ( $A_{280}$ ) e cálculo da razão  $A_{260}/A_{280}$ .



## 2.4 Oligonucleótidos

Os oligonucleótidos iniciadores LE1 (CCA AGC AAT GGC TAC TTC AAA G), LE2 (TGA GTT TGC CTT GCT GGT CAG T), LE3 (GCA AAG CAA TGG CTA CTT CAA) e LE4 (AAG AAA CAG TTT CCG CTG AGT T) usados neste trabalho basearam-se na sequência do gene da lectina da soja (Genbank Accession No. K00821), sendo desenhados por um software (<http://seq.yeastgenome.org>) e as sequências nucleotídicas submetidas a uma pesquisa de semelhança BLASTn, que confirmou a especificidade dos iniciadores. OS oligonucleótidos foram sintetizados por MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Alemanha).

## 2.5 Amplificação por PCR

A amplificação foi efectuada num volume de 25  $\mu$ L contendo 2  $\mu$ L de extracto de ADN purificado, 15 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,5  $\mu$ M de cada *primer* (LE3 e LE4), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogene, Carlsbad, CA), 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 1U de polimerase de ADN AmpliTaq Gold<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Branchburg, NJ).

Utilizou-se um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA) para a amplificação usando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 4 min; 35 ciclos de amplificação (30 s 94°C, 30 s a 60°C e 30 s a 72°C) e extensão final a 72°C durante 4 min.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos por electroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz UV. A imagem digital foi obtida com um sistema Kodak Digital Science DC120.

## 2.6 Amplificação por PCR em tempo real

A amplificação por PCR em tempo real foi efectuada num volume de 20  $\mu$ L contendo 2  $\mu$ L de extracto de ADN, 1x iQ SYBR Green Mix (BIORAD) e 0,5 mM de cada *primer* (LE1 e LE2). As análises por PCR em tempo real foram efectuadas num iCYCLER (BIORAD) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 4 min; 45 ciclos de amplificação (30 s 94°C, 1 min a 65°C); e *melting curve data* com aquisição de dados em intervalos de 15 s e incrementos de 0,5°C a partir de 65°C.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos rendimentos de extracção de ADN calculados por espectrofotometria UV a partir dos diversos alimentos analisados apresentam-se condensados nas Figuras 1a e 1b, nas quais se agrupam os produtos com rendimentos de extracção muito elevados e os produtos com menores rendimentos, respectivamente. A extracção de proteína de soja e grãos (farinhas) de soja permitiu a obtenção dos maiores rendimentos de ADN por mg de amostra com todos os métodos de extracção (Fig. 1a), sendo os maiores obtidos com os kits Nucleospin e Genespin. O método de extracção Wizard também permitiu a extracção de elevadas quantidades de ADN a partir de farinhas e proteínas de soja, enquanto com o método CTAB se obtiveram os menores rendimentos para estes produtos. A menor intensidade da banda de ADN genómico obtida na extracção de farinha de soja pelo método CTAB e as maiores intensidades para os outros métodos está concordante com os rendimentos obtidos (Fig. 2).

A extracção de várias amostras de tofu mostrou que o menor rendimento se obteve com o método CTAB, tendo os restantes métodos produzido resultados semelhantes (Fig. 1a).

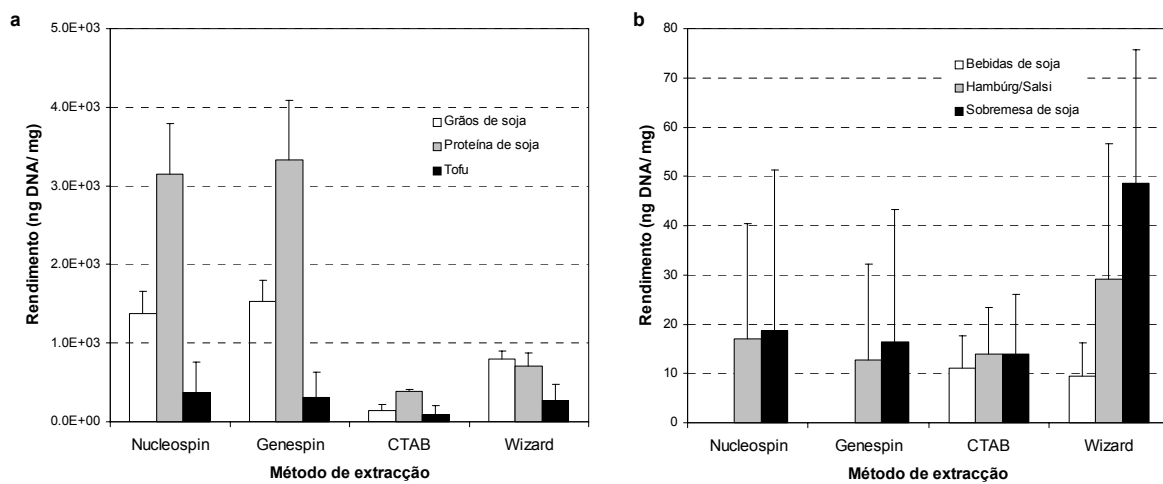
Todos os extractos obtidos pelos quatro métodos a partir de farinhas e proteínas de soja e tofu se apresentaram com elevada pureza (Tabela 1) ( $A_{260}/A_{280}$  em geral superior a 1,6), tendo as

respectivas amplificações por PCR do gene da lectina da soja conduzido a resultados positivos.

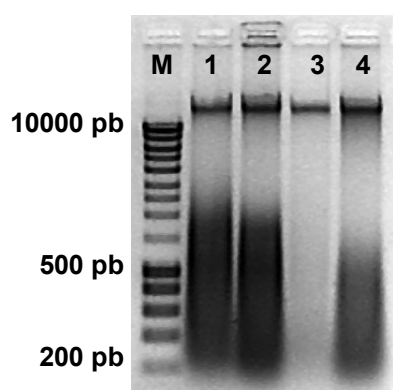
No que respeita a extracção de bebidas de soja, das 8 amostras analisadas apenas se conseguiu quantificar espectrofotometricamente a única amostra de bebida em pó por utilização dos kits Nucleospin e Genespin, sendo a amplificação por PCR positiva para cerca de metade das amostras (Tabela 1). Os métodos CTAB e Wizard permitiram a obtenção de rendimentos semelhantes para as bebidas de soja (Fig. 1b), no entanto o CTAB foi o que produziu melhores resultados para estes produtos por possibilitar amplificações positivas para as 8 amostras (Tabela 1).

Os molhos de soja não possibilitaram a obtenção de ADN amplificável por nenhum dos métodos utilizados, uma vez que todos os resultados foram negativos para o gene da lectina da soja (Tabela 1).

Os resultados da extracção de vários produtos pré-cozinhados (hambúrgueres, salsichas, etc) e sobremesas obtidas a partir da soja mostraram uma grande dispersão de resultados pelos elevados desvios associados. Tal facto deve-se à grande variabilidade de matrizes analisadas em cada grupo (diferentes composições e/ou processamentos), pois os resultados dizem respeito a amostras diferentes e não a réplicas da mesma amostra. O método de extracção Wizard foi o que permitiu maiores rendimentos médios de extracção para pré-cozinhados e sobremesas, enquanto os outros métodos apresentaram rendimentos médios semelhantes (Fig. 1b). No caso das sobremesas, o melhor resultado obteve-se com o método CTAB uma vez que a pureza dos extractos foi, em geral, superior, apresentando três amplificações positivas (Tabela 1). A amplificação do gene da lectina da soja dos extractos de produtos pré-cozinhados mostrou que os melhores métodos foram o CTAB e Wizard, uma vez que foram os que permitiram o maior número de amostras com ADN amplificável.



**Figura 1** – Quantidade de ADN obtido por miligrama de amostra extraída.



**Figura 2** – Análise electroforética de ADN extraído de farinhas de soja utilizando vários métodos. M, marcador de peso molecular (HyperLadder, Bioline); linha 1, Nucleospin; linha 2, Genespin; linha 3, CTAB; linha 4, Wizard

**Tabela 1** – Rendimento, pureza e detecção do gene da lectina da soja dos extractos de ADN de produtos de soja por utilização de vários métodos de extracção

| Amostra (100–500 mg)        | Método de extracção | ADN (ng/μL extracto) | A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> | PCR (+/total) |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|
| Grãos de soja/ Farinha      | Nucleospin          | 950,0–1865,0         | 1,5–2,0                            | 6/6           |
|                             | Genespin            | 1312,5–2285,0        | 1,7–2,0                            | 6/6           |
|                             | CTAB                | 51,0–241,0           | 1,7–2,0                            | 6/6           |
|                             | Wizard              | 671,0–962,0          | 1,8–2,0                            | 6/6           |
| Proteína de soja            | Nucleospin          | 2107,5–4070,0        | 1,7–2,0                            | 7/7           |
|                             | Genespin            | 2365,0–4415,0        | 1,4–2,0                            | 7/7           |
|                             | CTAB                | 350,0–424,5          | 1,7–2,0                            | 7/7           |
|                             | Wizard              | 443,0–1022,5         | 1,6–1,8                            | 7/7           |
| Bebidas de soja             | Nucleospin          | 244,5*               | 2,0*                               | 3/8           |
|                             | Genespin            | 105,5*               | 2,0*                               | 4/8           |
|                             | CTAB                | 13,5–101,5           | 1,3–2,0                            | 8/8           |
|                             | Wizard              | 19,8–122,3           | 1,5–2,0                            | 6/8           |
| Molhos de soja              | Nucleospin          | 0–22,8               | 1,2–1,5                            | 0/4           |
|                             | Genespin            | 8,5–19,8             | 1,5–1,9                            | 0/4           |
|                             | CTAB                | 11,3–24,5            | 1,4–1,6                            | 0/4           |
|                             | Wizard              | 47,5–67,8            | 1,1–1,2                            | 0/4           |
| Tofu                        | Nucleospin          | 43,5–1580,0          | 1,8–2,0                            | 5/5           |
|                             | Genespin            | 34,0–1385,0          | 1,6–1,8                            | 5/5           |
|                             | CTAB                | 14,8–557,5           | 1,4–2,0                            | 5/5           |
|                             | Wizard              | 148,3–1056,3         | 1,7–1,9                            | 5/5           |
| Sobremesas                  | Nucleospin          | 25,3–322,8           | 1,0–2,0                            | 3/6           |
|                             | Genespin            | 9,3–261,8            | 1,1–1,8                            | 2/6           |
|                             | CTAB                | 8,3–122,0            | 1,5–2,0                            | 3/6           |
|                             | Wizard              | 69,5–424,5           | 1,5–2,0                            | 2/6           |
| Hambúrgues/salsichas/outros | Nucleospin          | 10,0–424,3           | 1,0–1,8                            | 2/6           |
|                             | Genespin            | 11,5–355,3           | 1,4–2,0                            | 3/6           |
|                             | CTAB                | 10,3–160,8           | 1,1–1,9                            | 4/6           |
|                             | Wizard              | 89,5–449,8           | 1,4–1,6                            | 4/6           |

\* Resultado de apenas uma amostra onde foi possível detectar ADN espectrofotometricamente

Cada um dos 6 extractos provenientes de farinhas de soja foi diluído sucessivamente (1/2, 1/4, 1/8, 1/32, 1/64 e 1/128) e amplificado por PCR em tempo real. As curvas de correlação entre o logaritmo da concentração de ADN e o Ct (cycle threshold) permitiram calcular a eficiência da reacção para cada extracto obtido com os diferentes métodos. As eficiências das reacções obtidas variaram entre 93,0 e 122,1% (107,7±10,2%), com coeficientes de correlação superiores a 0,993 (0,996±0.003), com valores semelhantes para os quatro métodos de extracção.

## Referências

- [1] – C. James – Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/Crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34, ISAAA, Ithaca, New York (2005).
- [2] – I. Mafra, I.M.P.L.V.O. Ferreira, M.A. Faria e B.P.P. Oliveira – A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 4943.
- [3] – L. Olexová, L. Dovicovicová, T. Kuchta – Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *Eur. Food Res. Technol.* **218** (2004) 390.
- [4] – D.S. Smith, P.W. Maxwell – Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. *Food Control* **18** (2007) 236.
- [5] – C.F. Terry, N. Harris, H.C. Parkes – Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps for sample preparation and extraction. *J. AOAC Int.* **85** (2002), 768.
- [6] – I. Mafra, M.B.P.P. Oliveira – Detecção de soja geneticamente modificada em alimentos utilizando a técnica de PCR. CD-ROM de Actas (P3.24) do 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu (2005).
- [7] – M. Lipp, P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, E. Anklam – IUPAC collaborative trial study to detect genetically modified soy beans and maize in dry powder. *J. AOAC Int.* **82** (1999) 923.

# CARACTÉRISATION D'UNE FRACTION D'ALPHA-LACTALBUMINE HUMAINE ISOLÉE DES CASÉINES SUPPOSÉE ACTIVE CONTRE LA CROISSANCE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE "HUMAN COLON ADENOCARCINOMA" CACO-2.

*Barbana<sup>1</sup>, C.; Pérez<sup>2</sup>, M.D.; Sánchez<sup>2</sup>, L. ; Pocovi<sup>2</sup>, C. ; Calvo<sup>2</sup>, M. ; Alvarenga<sup>3</sup>, N. and Canada<sup>3</sup>, J.*

(1) Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT), 58 Avenue Alain Savary  
1003 El Khadra, Tunis, Tunisie.

(2) Tecnología y Bioquímica de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. 50013, Zaragoza, Espagne.

(3) ADCTA, Escola Superior Agraria de Beja, Rua Pedro Soares, 7801-902 Beja, Portugal.

## Résumé

Dans cette étude, une fraction qu'on a supposé active contre la croissance de la lignée cellulaire tumorale Caco-2 (human colon adenocarcinoma) a été isolée à partir de la caséine humaine par chromatographie d'échange ionique en gel de DEAE-Trisacryl M utilisant un gradient de chlorure de sodium. Une caractérisation de cette fraction active a été réalisée par différentes techniques incluant: méthodes immunochimiques, électrophorétiques (SDS-PAGE), et dichroïsme circulaire. Ces différents essais analytiques ont permis de montrer que cette fraction supposée active est composée d' $\alpha$ -lactalbumine, possédant une conformation spatiale proche de la protéine décalcifiée «Apo» mais qui reste différente de celle de la protéine native présente dans le lactosérum.

**Mot-clés:** Caséine,  $\alpha$ -lactalbumine, Conformation, Lignée Caco-2, Immunodotting, SDS-PAGE, Dichroïsme circulaire.

## INTRODUCTION

Le lait contient plusieurs nutriments qui jouent un rôle essentiel dans la protection des nouveau-nés, une grande partie des ces nutriments se trouvent dans le lactosérum.

L' $\alpha$ -lactalbumine est une petite protéine globulaire de masse moléculaire 14,1 kDa, très caractéristique des lactosérums de plusieurs espèces, sécrétés dans les glandes mammaires (Brew et Grobler, 1992). Sa concentration dans les laits bovin et humain varie de 1 à 2 mg/ml. Elle est formée de 123 résidus d'acides aminés et possède 4 ponts disulfure (Brew et Grobler, 1992).

L' $\alpha$ -lactalbumine est une métalloprotéine qui possède la capacité de fixer plusieurs cations; notamment le  $\text{Ca}^{2+}$  qui joue un rôle essentiel sur sa stabilité et le maintien de sa conformation native (Brew et Grobler, 1992). La fonction biologique de l' $\alpha$ -lactalbumine est sa participation dans la synthèse de lactose, elle se comporte alors comme une composante régulatrice de l'enzyme galactosyltransférase (Brew et Grobler, 1992). Thompson et al (1992) ont montré que l' $\alpha$ -lactalbumine est capable d'inhiber la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses A1N4 (cellules cancéreuses épithéliales) et MCF7 (cellules cancéreuses des seins).

Des études réalisées récemment avec l' $\alpha$ -lactalbumine humaine ont montré qu'une forme particulière de la protéine est capable d'induire un effet apoptotique (suicide cellulaire) sur

différentes lignées cellulaires tumorales (Hakansson et al, 1999). Cet effet est dû au passage de la protéine au noyau cellulaire induisant une fragmentation de l'ADN (Hakansson et al, 1999). Il paraît que la forme de l' $\alpha$ -lactalbumine humaine capable d'induire cet apoptose des cellules tumorales correspond à un mélange de polymères avec une structure tridimensionnelle légèrement différente de la forme monomère native stabilisée par l'acide oléique (Svensson et al, 1999).

Plusieurs études ont montré la capacité de l' $\alpha$ -lactalbumine de s'associer aux acides gras (Svensson et al, 2003b, Barbana et al, 2006).

L'objectif de notre travail consiste à isoler et caractériser la fraction polymérique de l' $\alpha$ -lactalbumine associée aux caséines humaines qu'on a supposé active contre la croissance des lignées cellulaires tumorales.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Matériel**

Les anti-immunoglobulines de lapin marquées par la peroxydase, ont été fournies par Sigma (Poole, U.K.). Les membranes de nitrocellulose sont de Bio-Rad (Richmond, USA). Le DEAE-Trisacryl M a été fourni par Biosepra (Villeneuve la Garenne, France), le 4-chloro-1-naphtol est de Merck (Darmstadt, Germany). Les échantillons de lait humain ont été fournis aimablement par l'Hospital Miguel Servet (Saragosse, Espagne).

### **Fractionnement du lait humain**

#### **Précipitation des caséines**

Les échantillons de lait humain ont été écrémés par centrifugation. Les caséines ont été obtenues par incubation à 4°C pendant 12 heures du lait écrémé avec de l'oxalate de potassium à 10% (p/v). Ensuite le pH du lait a été ajusté à 4.3 par une solution de HCl 1M suivi d'une incubation à 4°C pendant 12 heures. Finalement la solution a été incubée à 32°C pendant 2 heures. Les caséines précipitées ont été séparées par centrifugation à 5000 g pendant 15 min, lavées trois fois avec de l'eau distillé et lyophilisées.

#### **Fractionnement des caséines**

Une suspension formée 150 mg de caséines et 10 ml de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8.5 (Tampon A) a été appliquée dans une colonne (1.5 x 9 cm) en utilisant une pompe HPLC (Pharmacia) avec un gradient croissant de NaCl. L'élution des fractions protéiques a été réalisée en utilisant un débit de 1 ml/min avec un tampon B (tampon A avec 1 M de NaCl). Le programme d'application du gradient de NaCl a commencé par l'application de 15% de B de 0 à 60 ml suivi de l'application de 30% de B de 60 à 90 ml puis 100 % du tampon B a été appliqué à partir du volume 90 ml jusqu'à 100 ml. Finalement la colonne a été équilibrée de nouveau avec le tampon A. Des fractions de volume de 3 ml ont été collectées et l'absorbance a été déterminée pour chaque fraction à 280 nm. Les fractions protéiques collectées ont été dialysées avec de l'eau distillée pendant 48 heures avant qu'ils furent lyophilisées.

### **Caractérisation des fractions issues des caséines**

#### **Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec du SDS (SDS-PAGE)**

La SDS-PAGE a été réalisée dans le dispositif Phast-system (Pharmacia, Uppsala, Suède). Les gels de polyacrylamide utilisés ont été hétérogènes avec des gradients de concentrations de 8 à 25%. Les échantillons de protéines ont été dissous dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8 contenant 1 mM d'EDTA, 2,5% de SDS et 0,01 % de bleu de bromophénol, avant leur application sur le gel, les échantillons dissous dans le tampon ont été portés à ébullition pendant 5 min. La coloration s'effectuait avec du Bleu de Coomassie.

### Précipitation immunochimique «Immunodotting»

Des échantillons de 1 µl de solutions protéiques (2 mg/ml) ont été dilués dans un tampon PBS composé de 10 mM de phosphate de potassium, 0.15 M de NaCl à pH 7.4. Ensuite une goutte de chaque échantillon a été appliquée dans une membrane de nitrocellulose. Après séchage pendant quelques minutes, la membrane de nitrocellulose a été incubée avec 5% (p/v) d'ovalbumine dissoute dans le tampon PBS à 37°C pendant 30 minutes, suivie d'une autre incubation à 37°C/90 min dans l'antisérum anti- $\alpha$ -lactalbumine humaine dilué 1/10 dans du tampon PBS contenant 3% d'ovalbumine (P/V). Ensuite la membrane de nitrocellulose fut lavée exhaustivement avec du tampon PBS et incubée à 37°C/90 min avec les anti-immunoglobulines IgG de lapin marquées par la peroxydase et diluées 1/1000 dans du tampon PBS contenant 3% (P/V) d'ovalbumine. Après un lavage exhaustive avec du tampon PBS, l'enzyme a été révélée par l'application du 4-chloro-1-naphtol (substrat) comme décrit par Carré-Llopis & Escribano (1986).

### Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire (CD) correspondants à la fraction active isolée des caséines et à l' $\alpha$ -lactalbumine native, ont été réalisés dans un spectropolarimètre Jobin Yvon Mark CD6 dans des cuvettes circulaires de 0.1 cm de pas de longueur pour l'ultraviolet lointain et 1 cm pour l'ultraviolet proche. Les spectres UV proche ont été enregistrés entre 350 et 250 nm et ceux de l'UV lointain entre 245 et 185 nm. Le pas de la longueur d'onde utilisé a été de 1 nm. Les solutions protéiques ont été amenées à des concentrations de 70 µm dans un tampon Tris 5 mM à pH 7. Les spectres CD ont représenté la variation de l'ellipticité  $\Theta$  en  $\text{deg cm}^2 \text{dmole}^{-1}$  en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$ .

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les caséines humaines ont été obtenues du lait de trois donneurs différents par précipitation isoélectrique et ont été fractionnées par une chromatographie d'échange anionique. Trois pics ont été obtenus. Le 3<sup>ème</sup> pique d'absorbance plus réduite a été séparé qu'après avoir passé 1 M de NaCl (Fig1).

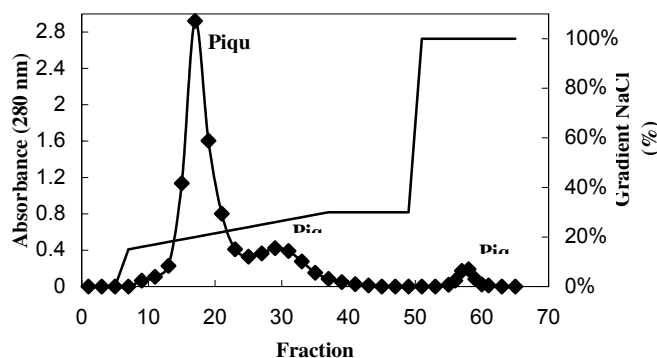


Figure 1: Profil chromatographique en DEAE Trisacryl-M des caséines humaines. (●) Absorbance à 280nm. (-) Gradient de NaCl (%). Volume de chaque fraction collectée est de 3 ml.

La SDS-PAGE a montré une bande majoritaire du 3<sup>ème</sup> pique à 14 kDa en plus d'autres bandes minoritaires correspondants aux poids moléculaires de l'ordre de 28 et 100 kDa (Fig2).

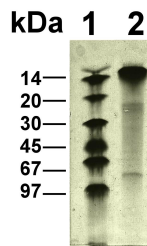


Figure 2: SDS PAGE du 3<sup>ème</sup> pique isolée des caséines humaines (ligne 2) et les standards de poids moléculaires (Ligne 1).

L'analyse immunochimique « Immunodotting » avec l'antisérum anti- $\alpha$ -lactalbumine humaine des trois piques a montré la présence de taches réactionnelles correspondants aux points d'application de l' $\alpha$ -lactalbumine et du 3<sup>ème</sup> pique de son fractionnement (Fig3), ce résultat montre la composition en  $\alpha$ -lactalbumine du 3<sup>ème</sup> pique de fractionnement des caséines iso-précipitées.

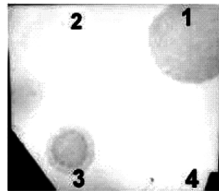


Figure 3: Analyse d'Immunodotting face à l'antisérum anti- $\alpha$ -lactalbumine humaine des piques du fractionnement des caséines issus de la chromatographie d'échange anionique. 1.  $\alpha$ -lactalbumine humaine; 2. pique 1 des caséines; 3. Pique 3 des caséines; 4. Pique 2 des caséines.

L'analyse des structures, secondaire et tertiaire, de la même fraction isolée des caséines a été déterminée par dichroïsme circulaire (Fig5). En UV lointain, le spectre présente une similarité avec celui de l' $\alpha$ -lactalbumine native, indiquant une similarité de structure secondaire entre les deux protéines riche en hélices  $\alpha$  (Fig4-1). Dans la zone de l'UV proche afin de déterminer la structure tertiaire, les résultats ont montré pour l' $\alpha$ -lactalbumine native un minimum à 270 nm dû aux résidus de tyrosine et un maximum à 294 nm dû aux résidus de tryptophane. Le 3<sup>ème</sup> pique de fractionnement des caséines a montré le même profil mais avec un signal plus faible (Fig4-2).



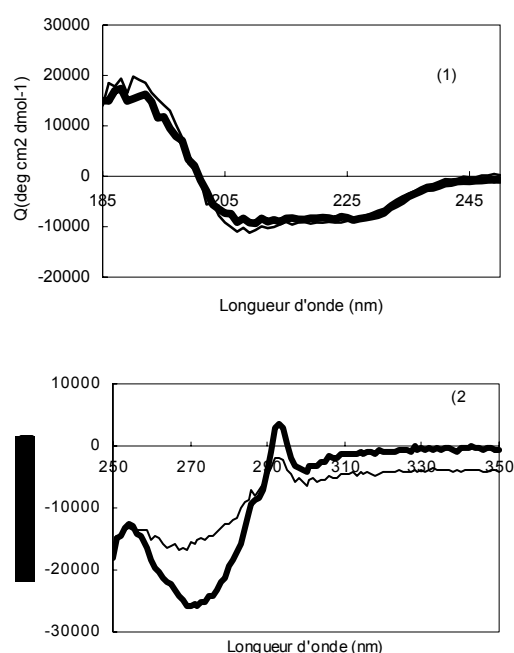


Figure 4: Spectres CD dans l'UV lointain (1) et dans l'UV proche (2) de l' $\alpha$ -lactalbumine humaine native (---) et le pique 3 des caséines (—).

On peut conclure de cette analyse que la structure secondaire du 3<sup>ème</sup> pique coïncide avec celle de l' $\alpha$ -lactalbumine humaine native, tandis que la structure tertiaire est altérée et se rapproche plus à celle de l'apo- $\alpha$ -lactalbumine comme a été montré par d'autres auteurs (Svensson et al, 1999 et 2003a).

## CONCLUSION

Dans ce travail on a pu isoler une fraction qu'on a supposé active contre la croissance des cellules tumorales Caco-2 par fractionnement des caséines iso-précipitées à pH 4.3, dans une chromatographie d'échange anionique. La caractérisation de cette fraction par diverses techniques nous a permis de conclure que cette fraction est composée majoritairement d' $\alpha$ -lactalbumine partiellement polymérisée et avec une structure tertiaire dénaturée par rapport à la protéine native.

## Références bibliographiques

- Barbana C., Pérez M.D., Sánchez L., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Haertlé T. & Calvo M., (2005a): Interaction of bovine  $\alpha$ -lactalbumin with fatty acids as determined by equilibrium partition and fluorescence spectroscopy. *International Dairy Journal*, 16, pp 18-25, 2006.
- Brew K. et Grobler J.A.,  $\alpha$ -Lactalbumin in: *Advanced Dairy Chemistry. Vol. I: Proteins*. Ed. FOX P.F. Elsevier, Oxford, 1992, pp191-223.
- Carré-Llopis A. & Escribano M.J. (1986): Isolation and characterization of two oncofetal glycoproteins from hamster pancreas using concanavalin A and preparative electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 880, 101-107.
- Hakansson A., Andersson J., Zhivotovsky B., Karpman D., Orrenius S. & Svanborg C (1999): Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell

- nuclei. *Exp. Cell Res.* 246, 451-460.
- Svensson M., Sabharwal H., Hakansson A., Mossberg A.K., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C. & Linse S. (1999): Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6388-6396.
  - Svensson M., Fast J., Mossberg A.K., Düringer C., Gustafsson L., Hallgren O., Brooks C.L., Berliner L., Linse S. & Svanborg C. (2003a): Alpha-lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.* 12, 2794-2804.
  - Svensson M., Mossberg A.K., Pettersson J., Linse S. & Svanborg C. (2003b): Lipids as cofactors in protein folding: stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.* 12, 2805-2814.
  - Thompson M.P., Farrell H.M., Mohanam S., Liu S., Kidwell W.R., Bansal M.P., Cook R.G., Kotts C.E. & Bano M. (1992): Identification of human milk  $\alpha$ -lactalbumin as a cell growth inhibitor. *Protoplasma* 167, 134-144.

# CARACTERIZAÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE VARIEDADES REGIONAIS DE OLIVEIRA (*Olea europaea*) PARA AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE VARIETAL DE AZEITES DOP

Lopes, J.<sup>1</sup>, Faria, M.A.\*<sup>1</sup>, Nunes, E.<sup>2</sup>; Oliveira, M.B.P.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmacia da Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, mfaria@ff.up.pt

<sup>2</sup> CIBIO, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, Rua do Monte-Castro, Vairão, 4480-661 Vila do Conde, enunes@mail.icav.up.pt

**Palavras-chave:** azeite DOP, autenticidade, ADN, microssatélites, PCR

**Resumo:** Este trabalho visou a construção de uma base de dados de perfis genéticos de variedades regionais transmontanas de Oliveira, nomeadamente a Cobrançosa, Verdeal Transmontana, Madural, Santulhana, Cordovil e Negrinha, para utilização como referência em futuros ensaios de autenticidade varietal de azeites. Para tal utilizaram-se 15 marcadores moleculares do tipo microssatélite ou SSRs (Simple Sequence Repeats). Estes marcadores para além de apresentarem um elevado nível de polimorfismo possibilitam a construção de bases de dados numéricas, o que facilita o tratamento estatístico e a transferência de dados entre investigadores. O ADN genómico foi obtido a partir de folhas desidratadas em gel de sílica através de um método clássico baseado na utilização de CTAB e de um kit comercial. Apesar da economia de tempo e solventes proporcionada pelo método comercial este não se mostrou eficiente no que diz respeito à pureza do extracto. Os marcadores utilizados permitiram a completa distinção das variedades estudadas tendo-se calculado uma probabilidade de identidade de  $1,52 \times 10^{-5}$ . A relação genética entre as variedades foi também determinada. Apresenta-se o dendrograma resultante onde são claros alguns agrupamentos.

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos agrícolas regulamentados pelos sistemas de Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP) caracterizam-se pela elevada importância tanto sócio-cultural como económica, com particular incidência a nível regional. Para que os referidos sistemas funcionem com credibilidade é necessário o desenvolvimento e disponibilização de metodologias analíticas que respondam com eficiência a eventuais problemas que possam surgir na correcta identificação de fraudes sobre os produtos protegidos.

Têm sido utilizadas várias metodologias para avaliar a autenticidade varietal de azeites virgens. A maioria dos trabalhos descritos na bibliografia recorre a técnicas cromatográficas para a quantificação de substâncias constituintes dos azeites, normalmente minoritárias, potencialmente capazes de funcionarem como marcadores químicos de autenticidade. Citam-se, como exemplos recentes, os trabalhos de Alves *et al.* <sup>[1]</sup> e Cunha *et al.* <sup>[2,3,4]</sup> onde foram testados como marcadores químicos esteróis e triacilgliceróis, respectivamente. É de salientar, todavia, a recente utilização de técnicas espectrométricas, como ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), com o mesmo objectivo da avaliação da origem de azeites, através do doseamento de vários metais. <sup>[5]</sup> Uma outra abordagem aos estudos de autenticidade de alimentos foi proporcionada pelo desenvolvimento das técnicas de análise de ácidos nucleicos mais acessíveis aos laboratórios de controlo de qualidade, como a técnica de PCR. Esta técnica possibilita, com relativa facilidade, o *fingerprinting* de genomas complexos permitindo a identificação inequívoca de

diferentes indivíduos. Esta possibilidade é particularmente útil no controlo de qualidade dos alimentos, uma vez que é muitas vezes necessária a correcta identificação de uma espécie ou variedade para avaliar a autenticidade de um produto, fresco ou processado. No caso do azeite DOP, a identificação das variedades constituintes é essencial para constatar a sua autenticidade pois, de acordo com a regulamentação Europeia em vigor (Regulamento EEC 2082/92), este deverá ser produzido respeitando uma lista de variedades autorizadas.

A identificação das variedades constituintes de um azeite por métodos moleculares requer o prévio *fingerprinting*, ou determinação do perfil genético, das variedades em questão, e a extracção de ADN da matriz azeite com qualidade suficiente para o tornar passível de análise. Este trabalho teve como objectivo um destes ensaios prévios: a construção de uma base de dados de perfis genéticos das variedades autorizadas para a produção de azeites DOP transmontanos. Com os dados obtidos foi possível proceder, também, à avaliação da proximidade genética das variedades.

Existem vários marcadores moleculares que permitem a obtenção do perfil genético de variedades de plantas, já utilizados na oliveira (e.g. RAPD, AFLP, SSR, ISSR, SNP, etc). Todavia, os que apresentam o maior grau de polimorfismo e facilidade de execução e leitura (de elevada importância na leitura de perfis complexos obtidos de amostras com misturas de variedades) são os SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélites, desenvolvidos para a oliveira por autores italianos e austríacos<sup>[6,7,8]</sup>, tendo sido os marcadores seleccionados para este trabalho.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras:** Foram analisadas 5 variedades regionais relevantes na produção de azeites DOP de Trás-os-Montes: Madural, Cobrançosa, Verdeal Transmontana, Redondal, Santulhana, e uma variedade produtora de azeitona de mesa, a Negrinha de Freixo. **Colheita e conservação:** Duas a três folhas jovens foram colocadas em tubos rolhados de plástico de 50 mL contendo gel de sílica com indicador de humidade, numa quantidade aproximadamente 15 vezes superior ao peso das folhas. Após um período máximo de 24 horas de secagem o gel de sílica foi renovado, os tubos foram colocados a -20 °C e aí conservados até ao momento da análise. **Extracção de ADN:** Compararam-se dois processos extractivos. Um deles baseado na utilização de CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamónio) e um kit de extracção EZNA-Plant DNA Mini Kit. A solução de extracção utilizada no método CTAB era constituída por 2% CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM e 2% de 2-mercaptoetanol, a pH=8. Os *pellets* de ADN obtidos redissolveram-se em 50 µL de 0,1x TE. As amostras foram armazenadas a 4 °C. Todos os extractos foram verificados e quantificados, por comparação com padrões de ADN *Lambda* a 2, 10 e 20 ng/µL, em gel de agarose 0,8%. **Amplificação:** Foram amplificados 15 *loci*: UDO99-(009-011-031-039-043); *ssrOeUa-DCA*(1-3-9-16-18) e *GAPU*(47,71B, 89, 101, 103A). As reacções de PCR foram realizadas num termociclador MJ PTC 100, em microtubos de 200 µl, num volume final de 20 µl, contendo 200 pmol de cada *primer*, 2,5 mM de cada NTP, 25mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq polimerase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) utilizando o respectivo meio tamponado. Os programas de amplificação utilizados foram os indicados na bibliografia, salvo ligeiras adaptações nas temperaturas de hibridação para controlo da especificidade da amplificação. **Electroforese:** Os produtos de PCR foram separados em gel desnaturante de acrilamida a 6% e visualizados através de um processo de coloração pelo nitrato de prata descrito por Bassam *et al.*<sup>[9]</sup> **Análise dos dados:** Para a leitura dos géis de acrilamida utilizou-se o padrão de peso molecular  $\phi$ X174 digerido com *Hinf*I, construindo-se, assim, uma tabela com os genótipos de cada variedade expressos em peso molecular dos alelos (pares de bases). Estes dados foram posteriormente analisados

com o programa MICROSAT para cálculo da probabilidade de identidade. Foi construído um dendrograma de relações genéticas utilizando distâncias Euclidianas e um algoritmo de aglomeração UPGMA.

### 3. RESULTADOS E CONCLUSÕES

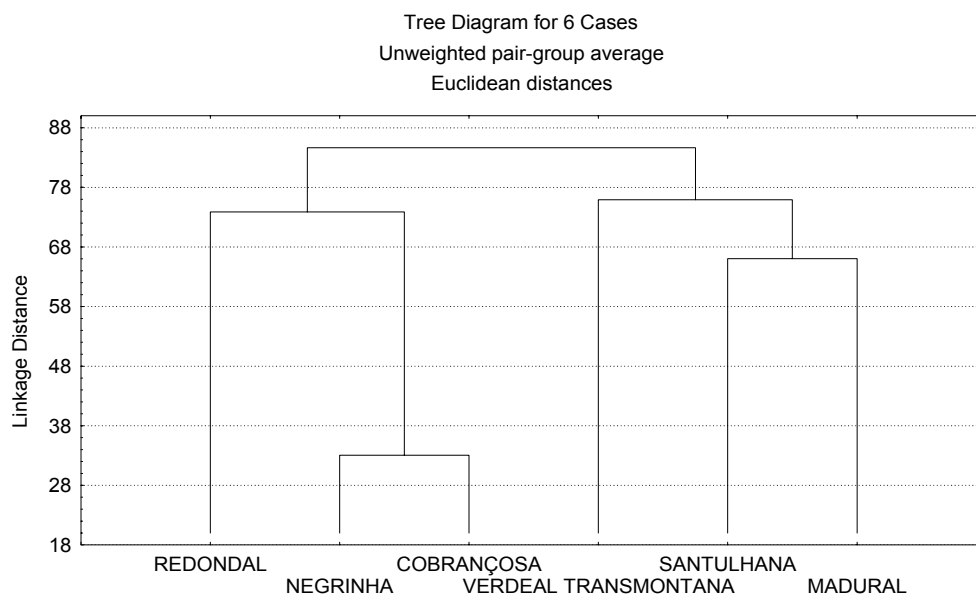
Todas as amostras originaram extractos de ADN com concentrações entre 5 e 25 µg/ml. A utilização do *kit* de extracção, embora proporcionasse extractos mais concentrados e com uma economia de tempo considerável, resultou em extractos cuja amplificação se mostrou, por norma, mais difícil, provavelmente devido a maior concentração de impurezas.

No quadro 1 apresentam-se os genótipos das amostras em estudo para cada um dos *loci* analisados. Esta informação constitui a base para futuros ensaios de autenticidade através da análise de extractos de ADN obtidos de azeites.

**Quadro 1.** – Genótipos das 6 variedades em estudo para 15 *loci*

|          | Madural |     | Cobrançosa |     | Santulhana |     | Negrinha |     | Redondal |     | Verdeal |     |
|----------|---------|-----|------------|-----|------------|-----|----------|-----|----------|-----|---------|-----|
| UDO 009  | 104     | 104 | 104        | 104 | 108        | 104 | 104      | 104 | 108      | 104 | 108     | 104 |
| UDO 011  | 122     | 122 | 138        | 122 | 138        | 131 | 122      | 122 | 132      | 120 | 138     | 132 |
| UDO 031  | 142     | 142 | 156        | 156 | 156        | 142 | 156      | 156 | 156      | 156 | 156     | 156 |
| UDO 039  | 187     | 179 | 187        | 187 | 187        | 179 | 187      | 179 | 187      | 187 | 179     | 179 |
| UDO 043  | 212     | 212 | 212        | 212 | 212        | 212 | 212      | 212 | 212      | 212 | 212     | 212 |
| DCA 1    | 225     | 217 | 227        | 217 | 225        | 217 | 227      | 217 | 225      | 217 | 225     | 217 |
| DCA 3    | 252     | 242 | 254        | 242 | 252        | 246 | 254      | 242 | 252      | 242 | 254     | 246 |
| DCA 9    | 191     | 167 | 211        | 167 | 199        | 191 | 191      | 167 | 211      | 199 | 211     | 199 |
| DCA 16   | 158     | 124 | 124        | 122 | 180        | 158 | 124      | 122 | 180      | 122 | 124     | 122 |
| DCA 18   | 182     | 178 | 186        | 176 | 182        | 176 | 182      | 178 | 186      | 176 | 186     | 178 |
| GAPU 47  | 187     | 177 | 183        | 177 | 187        | 177 | 187      | 177 | 187      | 177 | 187     | 177 |
| GAPU 71  | 148     | 132 | 148        | 126 | 132        | 122 | 132      | 122 | 132      | 122 | 148     | 128 |
| GAPU 89  | 208     | 164 | 208        | 164 | 208        | 164 | 208      | 164 | 180      | 164 | 180     | 164 |
| GAPU 101 | 203     | 195 | 219        | 195 | 203        | 195 | 219      | 203 | 219      | 195 | 203     | 203 |
| GAPU 103 | 188     | 188 | 138        | 138 | 188        | 154 | 138      | 138 | 138      | 138 | 188     | 154 |

A probabilidade de identidade (PI) cumulativa para os 15 marcadores foi de  $1,52 \times 10^{-5}$  o que corresponde a um potencial, do ponto de vista estatístico, de distinção de 152000 variedades. Os genótipos indicados no quadro 1, quando submetidos à análise estatística utilizando um algoritmo UPGMA, originam o dendrograma apresentado na figura 1.



**Figura 1.** Dendrograma das relações genéticas das 6 variedades estudadas

Pela observação da figura anterior pode constatar-se uma inequívoca discriminação de todas as variedades em estudo. Nota-se a existência de 2 grupos distintos, um deles constituídos pela Redondal, Negrinha e Cobrançosa e outro pela Verdeal Transmontana, Santulhana e Madural. Constata-se, também, a proximidade genética entre as variedades Negrinha e Cobrançosa, apesar de tradicionalmente serem utilizadas de forma muito distinta, azeitona de mesa e azeite, respectivamente.

Apesar da pequena amostra analisada, a diversidade genética é elevada, podendo assim antever-se a riqueza do germoplasma português de oliveira.

Com este trabalho foi possível obter uma base de dados numérica que poderá ser usada como referência em futuros trabalhos de avaliação da autenticidade de azeites por métodos moleculares, em desenvolvimento no nosso grupo de investigação. A avaliação das relações genéticas entre as variedades constitui também uma importante ferramenta para a correcta identificação das mesmas.

**Agradecimentos:** Fundação para a Ciência e Tecnologia, programa “Ciência e Inovação 2010”, pela concessão da bolsa BPD/20725/2004 a M.A. Faria.

### Referências

- [1] – M.R. Alves, S.C. Cunha, J.S. Amaral, J.A. Pereira, M.B. Oliveira – *Analytica Chimica Acta* **549** (2005) 166
- [2] – S.C. Cunha, J.S. Amaral, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira – *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 3351
- [3] – S.C. Cunha, S. Casal, M.B.P.P. Oliveira – *Ital. J. Food Sci.* **17** (2005) 447
- [4] – S.C. Cunha, M.B.P.P. Oliveira – *Food Chem.* **95** (2006) 318
- [5] – M. Zeiner, I. Steffan, I.J. Cindric – *Microchem. J.* **81** (2005) 171
- [6] – K.M. Sefc, M.S. Lopes, D. Mendonça, M.R. Santos, M.L.C. Machado, A.C. Machado – *Molecular Ecology* **9** (2000) 1171
- [7] – G Cipriani, M.T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato, R. Testolin - *Theor Appl Genet* **104** (2002) 223
- [8] – P. Rallo, G. Dorado, A. Martín – *Theor. Appl. Genet.* **101** (2000) 984
- [9] – B.J. Bassam, G. Caetano-Anolles, P.M. Gresshoff – *Anal. Biochem.* **196** (1992) 80

# COMPARAÇÃO DE AZEITES OBTIDOS POR PRODUÇÃO EM OLIVAL “TRADICIONAL” E OLIVAL “SUPER-INTENSIVO”

*Magalhães, S.C.F.P.; Vaz-Freire, L.<sup>1</sup>; Freitas, A.M.*

Departamento de Fitotécnia, Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora –  
Apartado 94, 7002-554 Évora, PORTUGAL  
Tel: +351 266760800 Fax: +351 266760828 Email: [luisvf@uevora.pt](mailto:luisvf@uevora.pt)

**Palavras – chave:** azeite, qualidade, olival, produção

**Resumo:** O principal objectivo deste trabalho foi comparar as propriedades químicas de azeites obtidos de azeitonas provenientes de dois maneios de cultivo diferentes, o tradicional e o super-intensivo. As variedades provenientes do olival super-intensivo foram a Cobrançosa, Galega Vulgar, Cordovil e Arbequina. As azeitonas provenientes do olival tradicional pertencem às variedades Cobrançosa, Picual e Azeiteira. Neste tipo de olival distinguem-se dois tipos, o tradicional com solo mobilizado e limpo e o tradicional com coberto vegetal. As análises e controlos realizados às azeitonas foram o índice de gordura, matéria seca e humidade através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o controlo do nível de pragas (gafa e mosca da azeitona), o nível de maturação. Para o azeite, extraído pelo equipamento Abencor, foram analisados a acidez, o índice de peróxidos, espectrofotometria no ultravioleta e o rendimento real para azeite. Verificou-se que os azeites obtidos das diferentes cultivares enquadram-se na categoria de Azeites Virgens Extra. De todos os parâmetros aqui estudados apenas o Índice de Maturação e o Rendimento podem ser atribuídos de forma significativa ao maneio, os restantes, são inerentes à própria variedade ou a outros factores de carácter agronómico ou tecnológico.

## 1. INTRODUÇÃO

O azeite pelo seu aroma, sabor particular, aliado ao alto valor nutritivo, bem como as suas propriedades antioxidantes naturais, tornou-se num alimento aplaudido quer por especialistas de saúde, gastrónomos, quer pelos consumidores que o elegemos como o melhor óleo vegetal. Este produto, tão complexo mas tão simples, é diariamente utilizado na maioria das casas, tem sido alvo de um estudo profundo das suas características químicas e do comportamento fisiológico da matéria-prima, possibilitando a obtenção de um azeite de extrema qualidade.

A procura da qualidade inicia-se desde a implantação da oliveira, variedade escolhida, local geográfico, estado sanitário das azeitonas, maturação, estendendo-se também à colheita, conservação e transformação da azeitona. As principais reacções que afectam a qualidade do azeite são: a hidrólise (aumenta a acidez), as oxidações (alteram o sabor e o cheiro), as reacções de fermentação, putrefacção e contaminação, que induzem a alterações organolépticas de vários tipos. Os factores físicos responsáveis pela degradação do azeite são a temperatura e a luz, a presença ou o contacto prolongado com metais (factor químico) e por último, os microrganismos e enzimas (factores biológicos) [1].

Existem outros factores que afectam a qualidade do azeite, os factores de carácter agronómico e de carácter tecnológico. Como factores agronómicos, a variedade que difere na sua composição química de um modo quantitativo, o momento da colheita, a própria colheita, as práticas culturais, etc. Como factores tecnológicos, os modos ou as condições de elaboração do azeite, como, por exemplo, o tempo de processamento, a temperatura de processamento, etc [2].

O azeite é um produto com potencialidades económicas no nosso país, sendo esta uma das razões para uma necessidade crescente de utilizar práticas alternativas ao olival tradicional.

As mobilizações reduzidas, a cobertura de solo na entrelinha e a prática de olival super-intensivo são alternativas possíveis de serem aplicadas no nosso país. Actualmente, têm-se verificado nas regiões oleícolas, a utilização de práticas de cultivo do olival alternativas, em detrimento da prática tradicional, devido à crescente preocupação com a conservação ambiental, mais particularmente, a conservação do solo e da água. Tradicionalmente, as práticas eram realizadas por intermédio de máquinas agrícolas de elevado porte, aumentando assim a possibilidade de erosão, compactação, menor aproveitamento da água da chuva, implicando deste modo maiores custos [3].

As práticas de cultivo alternativas estão fortemente a ser difundidas no nosso país, de modo a combater a elevada erosão, consequência das chuvadas de grande intensidade no fim do Outono [4]. Os baixos custos, a maior taxa de infiltração de água no solo, a fácil transitabilidade, aumento da biodiversidade no solo com consecutivo aumento da matéria orgânica e a fertilidade, são fortes razões para o uso de práticas alternativas.

Um outro cultivo de olival, é o modo super-intensivo. Apesar de terem sido realizadas algumas experiências com variedades portuguesas, a informação é ainda muito escassa, pelo facto de ser uma técnica nova. Neste sistema de cultivo, a densidade de plantas é elevada, e em compassos muito reduzidos. As práticas e cuidados efectuados são idênticos aos aplicados a outras árvores fruteiras com este maneio [2]. Os tratamentos, a aplicação de adubos, as necessidades de água são mais intensas. Os custos inerentes a este maneio são elevados, mas de longe superados pela produção.

Diversos autores mostraram que existem diferenças na produção de azeitona, quando se compara o olival tradicional e o olival com maneio alternativo [2, 3].

Com este trabalho pretende-se verificar se existe alguma relação entre a qualidade do azeite e o maneio utilizado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Todas as azeitonas utilizadas neste trabalho são provenientes de olivais, plantado em 1991 no caso do olival tradicional e plantado em 2002 no caso do olival super-intensivo, localizado na Herdade dos Lameirões, Safara, propriedade da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo.

### **2.2. Índice de Maturação (IM) e controlo de pragas**

Para as varias variedades para todos os tipos de maneio foi determinado o índice de maturação pelo método de Jaen, assim como o controlo de pragas para a gafa da azeitona (*Gloesporium olivarum*) e a mosca da azeitona (*Dacus oleae*).

### **2.3. Teor de água presente nas azeitonas**

A determinação do teor de água nas azeitonas foi efectuada segundo a Norma Portuguesa Definitiva NP-1304 de 1976.

### **2.4. Teor de Gordura, Percentagem de humidade e quantidade de matéria seca**

Para de terminar o teor de gordura e a percentagem de humidade nas azeitonas utilizou-se o método recorrendo Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Em que se pesaram 60g de pasta de azeitona previamente dissecada para um copo de vidro (150cm<sup>3</sup>), sendo efectuadas as leituras em RMN para cada amostra. A partir das leituras determinou-se o teor de (gordura) azeite, por comparação com as leituras obtidas numa amostra de azeite padrão, com o peso



conhecido (50g) [3]. Após a determinação de água e gordura pelo RMN foi possível determinar a quantidade de matéria seca.

### **2.5. Rendimento em azeite**

O rendimento foi determinado segundo o método de “Siol”. Para tal, moeram-se 1kg de azeitonas previamente lavadas e desprovidas de caules. Pesaram-se 600g da pasta obtida e previamente homogeneizada num copo metálico que foi colocado numa termobatedeira a uma temperatura de 25°C, durante 20 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 200cm<sup>3</sup> de água fervente, permanecendo mais 10 minutos na termobatedeira. Verteu-se a pasta para uma centrifugadora e adicionou-se água fervente para e limpar as paredes e centrifugou-se durante 1 minuto. Recolheu-se o mosto obtido para uma proveta (500cm<sup>3</sup>). A proveta permaneceu em repouso para que se evidenciassem as três fases. Efectuaram-se as leituras para determinação do volume de azeite obtido.

### **2.6. Acidez do azeite**

A acidez das amostras de azeite foram determinadas segundo o método sugerido pelo Regulamento CEE nº2568/91, anexo II

### **2.7. Índice de Peróxidos**

Para a determinação do índice de peróxidos utilizou-se a metodologia de análise descrita no Regulamento CEE nº2568/91, anexo III.

### **2.8. Espectrofotometria no Ultravioleta**

Este procedimento experimental realizou-se de acordo com o referido no Jornal Oficial das Comunidades Europeias NºL248/33, anexo IX.

Os resultados foram interpretados estatisticamente através da variância de médias ou ANOVA, utilizando o programa *StatView* para o *Windows* (versão 5.5, 1998).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Após a determinação de alguns parâmetros qualitativos segundo o Regulamento (CE) Nº 1989/2003, foi possível classificar as amostras de azeite como pertencentes à categoria de Azeite Virgem Extra.

Os Índices de Maturação (IM) determinados diferem de variedade para variedade e dentro da mesma variedade consoante o manejo de olival praticado. A Cobrançosa única variedade presente nos três maneios de olival estudados, apresenta diferentes valores para o IM. As azeitonas provenientes do olival que sofreu mobilização tradicional apresentam um maior IM. A variedade Picual que se encontra presente no olival tradicional com mobilização e no tradicional com cobertura de solo, também apresenta diferentes valores de IM, quer para os diferentes maneios, quer dentro do próprio manejo nas repetições realizadas. O intervalo de IM encontrado para esta variedade foi [3,22;5,63], representando o valor mínimo e o valor máximo. Mas foi no olival com cobertura que esta variedade obteve IM mais elevado. O mesmo aconteceu para a variedade Azeitona que se encontra presente apenas no olival tradicional (mobilizado e com cobertura), apresentou, no geral, maiores valores de IM, mas foi no olival com cobertura vegetal que o valor de maturação teve um valor mais elevado para todas as azeitonas (IM=6,34). Para as restantes variedades presentes no olival super-intensivo, como a Galega Vulgar, Cordovil e Arbequina, os valores de maturação foram muito diferentes. A variedade Cordovil apresentou os valores de IM mais baixos (IM=2,42), o IM da variedade Galega e Arbequina foi 5,39 e 4,01 respectivamente.

Verificou-se que quanto maior o IM, maior a incidência de pragas ou doenças nos frutos, para as variedades Cobrançosa, Picual e Azeiteira. No manejo super-intensivo, a variedade Galega, apesar de apresentar valores altos para IM, a percentagem de frutos afectados por mosca ou gafa foi muito baixo. A Cordovil apesar de ser uma variedade resistente à mosca encontrava-se altamente afectada. A Arbequina mostrou ser muito sensível à gafa.

Em relação aos parâmetros qualitativos, k232, Teor de Humidade, Teor de Gordura, Teor de Matéria Seca, para a variedade Cobrançosa, presente nos três diferentes maneios apresentou valores significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ). O Rendimento em azeite, os valores Acidez e de k270, diferem nos três maneios mas essa diferença não é significativa quando comparamos o manejo mobilizado e o manejo com cobertura. Os valores de Peróxidos também diferem, mas essa diferença não é significativa para o olival super-intensivo e o olival com cobertura vegetal. E o k não foi significativamente diferente.

Quando se compara a variedade Picual presente no olival tradicional mobilizado e no tradicional com cobertura verificou-se que o Rendimento em azeite, a Acidez do azeite, o Teor de humidade, Teor de Gordura, a Matéria Seca, k232 e os valores de Peróxidos são semelhantes nos diferentes maneios. Pelo contrário, os valores de k270 em Espectrofotometria em UV são significativamente diferentes para a mesma variedade em modos de cultivo diferentes tal como os valores de k.

A variedade Azeiteira também presente no olival tradicional mobilizado e tradicional com cobertura vegetal, apresenta, quando comparados, valores de Acidez, Peróxidos, Teor de Humidade, Teor de Azeite, Matéria Seca, k232, k270 e k são semelhantes ( $p > 0,005$ ), nos azeites obtidos. Apenas o Rendimento em azeite é significativamente diferente, apresentando valores superiores para o olival mobilizado.

Em relação às restantes variedades presentes no olival super-intensivo, o Rendimento em azeite e o Teor de Gordura, Teor em Matéria Seca apresentaram valores muito inferiores ao olival tradicional e em contrapartida a quantidade de água presente na azeitona era superior à média geral. Nos restantes parâmetros analisados, os valores não diferiram muito em relação aos obtidos por outras variedades.

#### **4. CONCLUSÃO**

A classificação do azeite em determinadas categorias não é exclusiva ou característica de uma única variedade ou de um determinado manejo agrícola. O estado de maturação, o estado sanitário e o processo de extracção inerente à obtenção de azeite contribuem todos para a sua diferenciação qualitativa.

A diferença de IM dentro da mesma variedade pode ter como causa o maior ou menor exposição solar dos frutos e uma competição por água e nutrientes. Os valores de IM são mais elevados para o olival com cobertura de solo, isto, deve-se provavelmente a uma maior disponibilidade de água e nutrientes para a planta.

A incidência de pragas não está directamente relacionada com o manejo praticado, mas sim com o Índice de Maturação. Um fruto menos maduro apresenta uma certa resistência ao aparecimento de doenças e pragas. A sua epiderme é muito mais resistente e é durante a maturação que se formam os compostos açucarados que servem de alimento a insectos ou de substrato para o crescimento de fungos.

Por as variedades Picual e Azeiteira apresentarem os valores dos parâmetros qualitativos semelhantes para os dois maneios. No caso da Cobrançosa, os resultados diferem de manejo para manejo, o que se pode dever a uma característica da variedade.

Os baixos valores obtidos para as variedades presentes no olival super-intensivo podem dever-se à não adaptação das variedades utilizadas naquele manejo ou ao facto deste olival ter apenas 4 anos, tempo insuficiente para evidenciar o seu potencial produtivo.

De um modo geral os diferentes manejos não influenciam directamente a qualidade do azeite, mas podem influenciar a maturação do fruto, o rendimento em azeite e o teor de gordura. Os outros parâmetros aqui analisados não mostraram ser influenciados pelo manejo.

### **Referências**

- [1] - Kiritsakis, A.; Kanavouras, A.; Kiritsakis, K. - "Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil" Eur. J. Lipid Sci Technology (2002).
- [2] - Barranco, D.; Fernandez Escobar, R.; & Rallo, L.; - "El cultivo del Olivo" Departamento de Agronomía, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba; 5ª Edición Córdoba (2004) 800
- [3] - Correia, T. M. L.; "Estudo Comparativo entre as mobilizações tradicionais do solo no olival com a prática de coberto vegetal", Tese de Licenciatura em Eng. Agrícola pela Universidade de Évora **82**, Évora (2002)
- [4] - Rodrigues, M. A.; Bento, A.; Lopes, J. L.; Torres, L.; Pereira, J.A.; "Manutenção da Superfície do solo em Olival", Revista de Ciências Agrárias Volume XXIV números 1 e 2 , **20-25**, (Jan.-Jun. 2001) 246

# FOSFATOS NATURAIS E ADICIONADOS EM PRODUTOS DA PESCA

*Afonso\*, C.; Santos, J.P.; Lourenço, H.M.; Martins, M.F.; Nunes, M.L.*

Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, INIAP-IPIMAR, Av. Brasília,  
1449-006 Lisboa, Portugal

## Resumo

Desde o período da 2ª Guerra Mundial que houve a necessidade de adicionar fosfatos como forma de garantir a qualidade tanto em produtos cárneos como em produtos da pesca. A utilização destes compostos no tratamento do pescado, antes da congelação, tem como principal objectivo aumentar a capacidade de retenção de água, uma vez que, durante a armazenagem em congelado, pode ocorrer uma perda de água. A diminuição do teor em água traduz-se ao nível dos atributos sensoriais dos produtos, nomeadamente, alteração do sabor e perda de suculência. No entanto, um produto com elevado teor em água, devido à excessiva aplicação de fosfatos, resulta numa fraude económica pois o consumidor estará a pagar água ao preço do produto. Neste sentido tem sido importante legislar as quantidades máximas, deste tipo de compostos, a adicionar, sempre que possível, aos produtos da pesca. É necessário não esquecer contudo, que o fósforo existe naturalmente nos produtos da pesca, sendo uma boa fonte deste elemento na dieta alimentar. Actualmente existem técnicas que permitem determinar o teor de fosfatos totais mas que não distinguem a proveniência deste. Assim, o objectivo deste trabalho foi o de montar e validar um método que permitisse distinguir o fósforo natural dos fosfatos adicionados de modo a poder verificar se os produtos cumprem com a legislação em vigor e comparar com o método de determinação de fosfatos totais.

Os resultados preliminares indicam que é possível distinguir os fosfatos naturais dos adicionados através da técnica de UV/Vis.

**Palavras-chave:** fosfatos naturais, fosfatos adicionados, validação de métodos

\*Autor a quem deve ser enviada a correspondência.

Tel.: +351-21-3027154; fax: +351-21-3015948

*Endereço electrónico:* [cafonso@ipimar.pt](mailto:cafonso@ipimar.pt)

# MARGARINE QUALITY MONITORING BASED ON REFLECTANCE SPECTROSCOPY

*Martins<sup>1</sup>, R.C.; Lopes<sup>2</sup>, V.V. and Vicente<sup>1</sup>, A.A.*

<sup>1</sup>Institute for Biotechnology and BioEngineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. <sup>2</sup>LaSEEB, Institute of System and Robotics, I.S.T. Technical University of Lisbon, Av. Rovisco Pais, P-1049-001 Lisbon, Portugal.

**Keywords:** UV-VIS-SWNIR spectroscopy, statistical process control, quality monitoring, principal component analysis, multiplicative scatter correction.

## **Abstract:**

Margarine is a term that can indicate any of a wide range of butter substitutes. Due the raw material great diversity, margarine end-product quality characteristics are expected to be highly diversified. This article proposes the use of reflectance UV-VIS-SWNIR spectroscopy to monitor the margarine end-product quality properties. The main effort in this work was the development of a fast monitoring procedure to assess the quality of the manufactured margarines.

The study was performed on two margarine products: regular margarine (<80% fat) and reduced-fat margarine (<60% fat). The nine product samples were collected during the production line normal operating conditions on different days. The samples had the surface cleaned in order to remove any sign of oxidized material. Then, spectra were collected by a reflectance probe normal to the sample surface. The samples temperature was recorded ( $10.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ ) and the probe-sample distance was kept constant for all the samples. The integration time was set to 40s for the collection of the five UV/VIS spectra per samples; the three VIS/NIR spectra per sample were collected using a 10s integration time. The data analysis was performed on each product and for each spectral range independently. The spectra were normalized by its maximum intensity and the corrected for using a robust multiplicative scatter correction algorithm. A principal component analysis was performed to the pre-process spectra and the multivariate statistical process control limits were determined with bootstrap for each product/spectral range.

Results show that UV-VIS-SWNIR reflectance spectroscopy provides a quick and fast assessment of these products characteristics and thus it can be used as an indication of the overall product variability with can be plotted into a multivariate control chart.

## MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA A ANÁLISE DE MACRONUTRIENTES

*Mota, C.; António, C.; André, C.; Coelho, I.; Castanheira, I.*  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Lisboa – Portugal

A importância da utilização de materiais de referência na análise da composição dos alimentos é actualmente reconhecida devido à crescente exigência de garantia da qualidade. Estes materiais proporcionam a rastreabilidade das medições, prendendo-se as suas principais aplicações com a validação de métodos, calibração de equipamentos e controlo da qualidade. O projecto Laboratório de Materiais de Referência para a Segurança Alimentar (LMARSA), visa entre outras actividades desenvolver metodologias analíticas com vista à caracterização de materiais de referência para a análise de macronutrientes, vitaminas e minerais. O LMARSA tem como principal objectivo disponibilizar aos intervenientes na cadeia alimentar, ferramentas adequadas ao desenvolvimento de metodologias de calibração, validação e de avaliação do desempenho, inerentes à qualidade dos produtos e necessárias para actividades de acreditação, regulamentação, fiscalização, vigilância e monitorização.

Nesta comunicação são apresentados os trabalhos desenvolvidos para a produção de materiais de referência a utilizar na análise de macroconstituintes. São introduzidas as estratégias seguidas para implementação do Guia ISO 34 sobre os requisitos da competência técnica dos produtores de materiais de referência. Apresentam-se alguns resultados de estudos desenvolvidos para a caracterização dos macroconstituintes em leite. Os resultados evidenciam que nem todos os nutrientes podem ser caracterizados na mesma matriz, pelo que é apresentada a metodologia seguida para a selecção dos nutrientes e consequente caracterização dos valores a certificar. Tendo presente que a estabilidade e a homogeneidade são dois requisitos primordiais apresentam-se igualmente resultados que mostram ser possível definir as condições preferenciais de armazenamento e transporte. Em complemento são discutidas as abordagens sobre a incerteza da medição. Com os resultados do primeiro ano de projecto é possível demonstrar que a rastreabilidade dos resultados analíticos a incorporar numa tabela de composição de alimentos fica assegurada, desde que os materiais de referência internos, utilizados, sejam parte de uma cadeia de rastreabilidade, encimada por materiais de referência certificados.

Agradecimentos: Projecto “Laboratório de Materiais de Referência para a Segurança Alimentar”  
POR/3.1.015/DRELVT

# **MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE PÓS-COLHEITA EM CAFÉ (*Coffea arabica* L.) COLHIDO EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO PARA VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES FÍSICO- QUÍMICAS.**

*Santos, R.A.<sup>a\*</sup>; Palácios-Cabreira, H.A.<sup>b</sup>; Oliveira, R.G.<sup>a</sup>; Prado, M.A.<sup>a</sup>*

<sup>a</sup> Departamento de Ciências de Alimentos, FEA – UNICAMP, CEP 13083-862, Campinas-SP, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, CEP 13070-178, Campinas-SP, Brasil

A cadeia produtiva do café no Brasil vem passando por profundas transformações desde a década de 70. A crescente demanda dos países importadores por um café de boa qualidade, juntamente com o surgimento de uma consciência entre os consumidores brasileiros de não se sujeitarem a adquirir o resíduo desta exportação, impõem aos produtores de café a elaboração e comercialização de um produto diferenciado. Portanto, a necessidade de produzir bons cafês, de forma segura e padronizada, tornou-se um aspecto imprescindível para a conquista de novos mercados. Diante desta estratégia, o presente trabalho objetiva assegurar a qualidade e contribuir na rastreabilidade das etapas de produção de café arábica, através do processo de seca natural, da variedade Mundo Novo, monitorados em três diferentes estágios de maturação: 100% cereja, 90% cereja e 10% verde, e 70% passa (seco na árvore). Os dois primeiros estágios foram colhidos na mesma época e o terceiro, colhido do mesmo talhão, 45 dias após a primeira colheita. Todas as etapas de pós-colheita dos três lotes de cafês foram monitoradas através de um rigoroso *check list* e amostrados de forma criteriosa para a realização das seguintes análises: umidade, proteínas e lipídeos, para verificar a variação na composição físico-química dos cafês ocorrida nestes três diferentes estágios de maturação durante todas as etapas de produção: colheita, secagem em terreiro, secador rotativo, armazenamento em tulha e armazém. Uma vez que, as alterações ocorridas durante o pós-colheita podem comprometer a qualidade dos grão e da bebida.

\* rlela27@yahoo.com.br

## **AGUARDENTE DE MEDRONHO: CONTRIBUTO PARA A RASTREABILIDADE**

*Galego, L.*  
lgalego@ualg.pt  
Escola Superior de Tecnologia  
Universidade do Algarve  
Campus da Penha  
8005-139 Faro

### **Resumo**

A aguardente de medronho, o queijo de cabra e o mel eram os produtos que no início dos anos 90 mais contribuíam para os rendimentos da população da Serra do Caldeirão (INDE, 1993). Este motivo levou a que várias Instituições, principalmente do Algarve, com a contribuição do Baixo Alentejo, se envolvessem em Projectos que viriam a contribuir para a caracterização e melhoria da qualidade desse destilado.

O Decreto-Lei nº 238/2000, de 26 de Setembro de 2000 veio pela primeira vez estabelecer as características mínimas a que deve obedecer uma aguardente de medronho. Alguns produtores legalizados passaram a receber os resultados das análises, de controlo oficial, com as indicações de não conformidade de acordo com a legislação e preocupados têm procurado ajuda.

Enquanto são feitas diligências para a melhoria da qualidade, os produtores, têm sido simultaneamente informados da necessidade de implementação de sistemas de auto-controlo e posteriormente de sistemas de rastreabilidade, obrigatórios para todos os países da comunidade desde 1 de Janeiro de 2005, de acordo com o Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu.

INDE, (1993). Documento de trabalho produzido para a Associação *In Loco*, Lisboa.  
Decreto-Lei nº 238/2000 de 26 de Setembro, Diário da Republica I série A, Imprensa Nacional, 80, p. 5145-5147.  
Regulamento (CE) nº 178/2002 da comissão de 8-2, Jornal Oficial nº L 39.



# OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO USADO PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBAMATO DE ETILO EM VINHOS MADEIRA

*Rosenberger, M.; Pereira, V.; Câmara, J.S.; Marques, J.C.*

Centro de Química da Madeira, Departamento de Química da Universidade da Madeira  
Campus da Penteada, 9000-390 Funchal

Tel +351-291 705100 Fax +351-291 705149 e-mail: [marques@uma.pt](mailto:marques@uma.pt)

**Palavras-chave:** vinhos, Madeira, carbamato, SPME

**Resumo:** Os Vinhos Madeira são, em geral, submetidos a um processo de estufagem após a fortificação. Este aquecimento favorece a formação de carbamato de etilo (CE) pelo que se torna importante o desenvolvimento e optimização de um procedimento simples mas eficaz de controlar a formação durante a estufagem. O método usado tem por base a metodologia de micro-extracção em fase sólida (SPME), seguida de análise por GC/MS equipado com uma coluna polar SGE (30m x 0,25mm) e modo de detecção SIM (m/z 62). O procedimento pode ser usado com vantagem para o controlo da formação de CE durante a estufagem para valores próximos do limite seguido pela indústria: 100 µg/L.

## 1. INTRODUÇÃO

O carbamato de etilo tem sido referenciado como agente carcinogénico moderadamente potente, que se pode formar naturalmente nas bebidas alcoólicas obtidas por fermentação. Usado como anestésico em animais de laboratório até à década de setenta, dado o impacto pouco significativo a nível dos parâmetros bioórgânicos, a detecção de possíveis efeitos cancerígenos levou a um aumento dos estudos de que resultou a diminuição do seu uso. Os estudos realizados na altura sobre a presença em bebidas alcoólicas levaram inicialmente à proibição do uso de pirocarbonato de etilo como conservante e, posteriormente, ao rastreio exaustivo realizado pelas autoridades canadianas em que foram detectados valores significativos em bebidas destiladas e brandies. Em consequência, o Liquor Control Board of Ontário veio a estabelecer em 1985, limites bastantes restritivos com base num consumo não superior a 3 µg/kg e por dia, que se traduziu num máximo de 30µg/l de carbamato de etilo em vinhos de mesa; 100µg/l em vinhos generosos; 150µg/l em aguardentes e whiskies e 400µg/l em aguardentes de frutos e licores. Também em 1988 o FDA acordou valores de até 15µg/l para vinhos de mesa e 60µg/l para vinhos generosos. Estes limites levaram ao aparecimento de vários estudos quer para a optimização de uma metodologia de extracção e análise quer da determinação dos mecanismos da sua formação.

A formação de carbamato de etilo é geralmente relacionada com a presença de ureia e etanol, sendo a reacção particularmente favorecida quando as temperaturas de conservação são elevadas. A ureia é considerada o principal precursor pelo que as condições que influenciam o seu teor, incluindo as práticas de fertilização e a fortificação, são potenciadoras da formação de carbamato de etilo. De notar que não é totalmente conhecido o modo como o carbamato de etilo actua no organismo, existindo algum consenso que o composto em si não é cancerígeno mas pode originar, no metabolismo, o aparecimento de compostos com efeitos cancerígenos que actuam a nível dos ácidos nucleicos e aminoácidos.

Os Vinhos Madeira são, em geral, submetidos a um processo de estufagem (até 45 °C durante cerca de 3 meses) após a fortificação, processo responsável pela longevidade e pelo “*bouquet*” típico destes vinhos. Para além do eventual impacto das práticas de fertilização em uso, influenciando nomeadamente o nível de arginina (precursor da ureia), o processo de vinificação do vinho Madeira pode levar a um aumento significativo dos teores de carbamato de etilo presente nestes vinhos quer através da fortificação, favorecendo a libertação da ureia, quer em resultado da exposição ao calor durante o período de estufagem. Têm sido reportados valores típicos de até 20 µg/l nos vinhos antes da estufagem, processo que faz aumentar o teor de duas a três vezes[1]. Este facto torna extremamente importante dispor de um método simples e reprodutível não só para determinar o teor final de CE no vinho, mas também para permitir o controlo da sua formação durante a estufagem e, posteriormente, durante o longo armazenamento.

O método mais comum para a determinação de carbamato de etilo envolve a extracção, com diclorometano em coluna de extracção em fase sólida, seguida de concentração e separação cromatográfica e análise por GCMS[2]. Esta metodologia foi adoptada quer pela OIV para análise de vinhos, quer pela AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) para análise de bebidas alcoólicas. Outros métodos de extracção e de análise têm sido propostos, entre os quais a micro-extracção em fase sólida (SPME) que tem merecido um interesse crescente dada a sua simplicidade e pelo facto de não necessitar de utilizar solventes de extracção[3] [4].

O objectivo deste estudo foi o de determinar a possibilidade de utilizar a técnica de SPME para a determinação rápida de carbamato de etilo quer em vinhos Madeira comerciais, quer em vinhos em curso de estufagem, comparando os resultados com a metodologia aprovada pela OIV.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Neste estudo foram testadas duas metodologias de extracção do carbamato de etilo em vinhos Madeira: o método de extracção por SPE adoptado pela OIV e a microextracção em fase sólida. Nos dois casos optou-se pela análise por GCMS.

### *Método OIV:*

Amostras de 5 ml de vinho foram diluídas e transferidas para colunas de extracção em fase sólida (Varian ChemElut2050) e extraídas com diclorometano. O extracto foi depois concentrado por evaporação a temperatura controlada até se obter cerca de 1 ml de solução, que foi analisada por GCMS.

### *Método SPME:*

Amostras de 50 ml de vinho foram colocadas em tubos de 50ml com 5 g de NaCl. Após agitação durante 15 minutos a 22 °C, a fibra de CW/DVB foi colocada no espaço de cabeça do tubo durante 30 min, após o qual foi colocada no injector do GCMS para análise.

### *Análise por GCMS:*

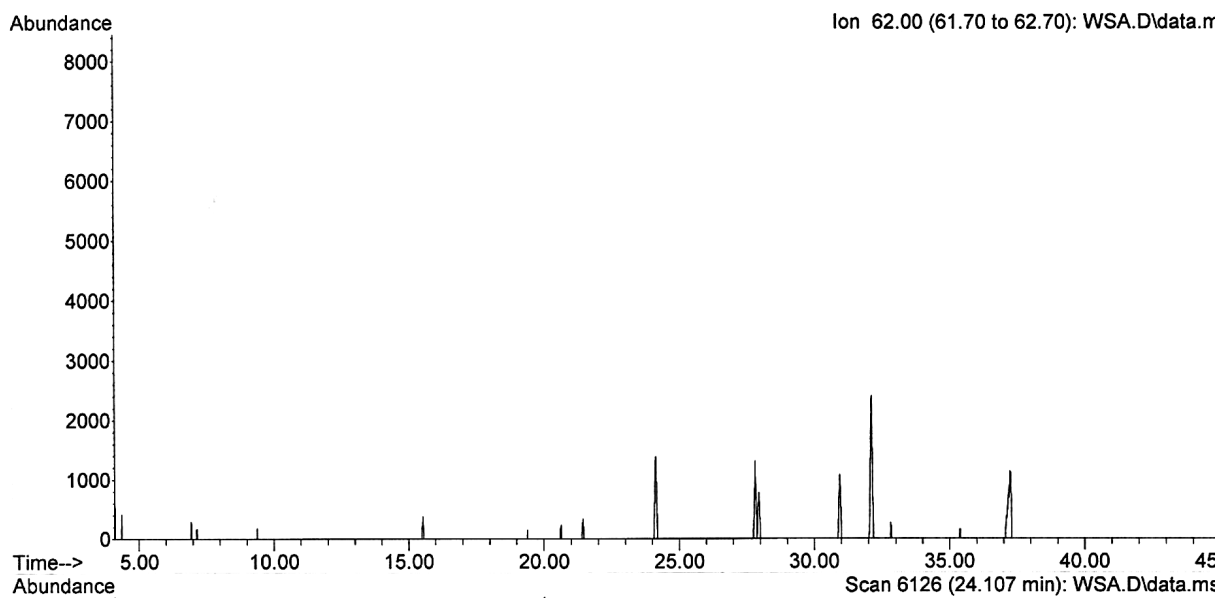
A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar SGE 054428 (30 m x 0,25mm), usando He como gás de arrasto. A temperatura do injector (em modo splitless) foi colocada a 250 °C. A coluna foi colocada a 40°C durante 5 min, subindo para 60 °C a 10 °/min, depois para 150 °C a 2,5 °/min e finalmente até 220° C a 50°/min. A detecção foi realizada em modo

SIM (single ion monitoring) por monitorização do ião de m/z 62. Seguindo a metodologia adoptada pela OIV, foi usado carbamato de propilo como padrão interno.

### 3. RESULTADOS

Foram analisadas amostras de vinhos Madeira colocadas a estufar a 55 °C. Esta temperatura, cerca de 10 °C mais elevada que a habitualmente usada na estufagem, foi seleccionada de modo a potenciar a formação de carbamato de etilo. Os resultados obtidos com o método OIV, confirmam valores antes de estufagem em geral inferiores a 20 µg/l (as variações estão relacionadas quer com as práticas de fertilização quer com as diferentes condições de fermentação usadas na vinificação do vinho Madeira) que sobe para um valor médio em geral inferior a 60 µg/l quando os vinhos são estufados a temperaturas não superiores a 45 °C. A temperaturas de estufagem superiores (55 °C), o teor final de carbamato de etilo aumenta para valores de cerca de 115 µg/l (ver Fig.1.). A metodologia é reprodutível mas a sensibilidade é reduzida pelo que é sempre necessário concentrar a amostra final (de 5 para 1 ml) para se conseguir uma boa reprodutibilidade para valores inferiores ao limite estabelecido pelas autoridades canadianas (100µg/l). Esta concentração exige a utilização de diclorometano de elevada qualidade (ou submetido previamente a destilação) de modo a eliminar impurezas do solvente.

```
file      :C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\CURSO\M
..       Dchem\1\DATA\Manuela.D\OIV.D\WSA.D
operator  : Manuela
instrument : GCMSD
acquired  : 15 Nov 2006 17:50      using AcqMethod CARBAMATOETILO.M
sample Name: WSA
disc Info : calibration
```



**Figura 1** – Amostra de vinho Madeira (casta Tinta Negra Mole) após estufagem a 55° C, durante 3 meses – tempo de retenção (EC): cerca de 24,1 min

O método de extracção por SPME, correntemente utilizado no laboratório para a determinação de voláteis de vinhos Madeira, revelou-se uma boa alternativa para valores

elevados de carbamato de etilo (superiores a 100µg/l). O principal problema encontrado foi a baixa sensibilidade do método, já detectada na determinação de voláteis. Na realidade, o elevado teor em etanol dos vinhos Madeira (cerca de 18%) faz que este álcool seja preferencialmente adsorvido pela fibra, diminuindo a adsorção de compostos de teores mais baixos. Este efeito pode ser diminuído utilizando outra fibra (nomeadamente PA-85µm) ou diluindo a amostra inicial de modo a diminuir o teor de etanol.

Em conclusão, o método de SPME para a determinação rápida de carbamato de etilo em vinhos Madeira parece uma boa alternativa à extracção por solventes, apresentando uma boa linearidade e reprodutibilidade. No entanto, o teor elevado de etanol, limita a sua utilização por elevar o limite de quantificação para valores que, sendo aceitáveis para o controlo de vinhos comercializados, não o são para o controlo da formação de carbamato de etilo durante a estufagem. Estão em curso ensaios com outras fibras de modo a determinar o efeito da adsorção do etanol e limitar o impacto na sensibilidade da fibra ao carbamato de etilo.

### Referencias

- [1] – M.A. Ferreira, J.O. Oliveira – Am. J. Enol. Vitic., **43** (1992) 339
- [2] – S.M. Abreu, A. Alves, B. Oliveira, P Herbert – Anal. Bioanal. Chem., 382(2005) 498
- [3] – R.s. Whiton, B.W. Zoecklein – Am. J. Enol. Vitic., **53** (2002) 60
- [4] – D.W.Lachenmeier, U. Nerlich, T. Kuballa – Journal of Chromatography A, 1108 (2006) 116

# **TRANS-RESVERATROL CONTENT IN MUSCATEL FORTIFIED WINES FROM SETÚBAL REGION**

Bravo, M.N.<sup>1,2</sup>; Feliciano, R.<sup>2,3</sup>; Silva, S.<sup>2,3</sup>; Coelho, A.V.<sup>2,5</sup>; Vilas Boas, L.<sup>2,4</sup>; Bronze, M.R.<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras, Portugal

<sup>3</sup> Instituto Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

<sup>4</sup> Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

<sup>5</sup> Universidade de Évora, Departamento de Química 7000 Évora, Portugal

Tel: +351-214469770 Fax: +351-214417062 E-mail: [mbronze@itqb.unl.pt](mailto:mbronze@itqb.unl.pt)

**Keywords:** Muscatel wine; *trans*-resveratrol; analysis; HPLC

## **Abstract**

Stilbenes are important phenolic compounds present in wines: *trans*-resveratrol has been reported to be responsible for chemopreventive activity with antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties and is found in grapes and wines. Liquid chromatography (LC) associated with Uv-vis diode array (DAD), fluorescence (FD) and electrochemical (ED) detectors were used to quantify *trans*-resveratrol in Muscatel fortified wines from Setúbal region. Samples were collected during wine production at three representative producers. Mass spectrometry coupled to LC (LC-MS) was used for identification purposes. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for fluorescence detection were 0.013 and 0.040 mgL<sup>-1</sup> respectively. Higher limits were obtained with electrochemical and Uv-vis detection modes, respectively: 0.34 and 1.04 mgL<sup>-1</sup> and 0.019 and 0.060 mgL<sup>-1</sup>. Results obtained in analysis of different samples show that the *trans*-resveratrol content decreases along the winemaking process. Concentration values obtained for *trans*-resveratrol in wines at different processing stages, ranged from 0.108±0.004 to 0.360±0.004 mgL<sup>-1</sup> and for commercial wines the highest concentration was 0.129 ± 0.004 mgL<sup>-1</sup>.

## **1. INTRODUCTION**

Stilbens belong to the non-flavonoid class of phenolic compounds. Among them resveratrol is the major component present in grapes and occurs as two isomeric forms (*trans* and *cis*). The most abundant form is *trans*-resveratrol and is mainly located in grape skins [1,2].

The occurrence of resveratrol in plant tissues has been related with the resistance of plant against fungal diseases as downy mildew and gray mold, caused by *Plasmopara viticola* or *Botrytis cinerea*. Resveratrol content may also increase due to abiotic stress, such as UV irradiation. Grapes and red wines are among the major dietary sources of stilbenes [1,3]. Due to resveratrol antibacterial, antifungal, and antioxidant properties, data concerning its content in grapes and wines have been published [4].

The concentration of *trans*-resveratrol in the skin of ripening grapes varies considerably, depending on the grape variety [1,5], the different climatic conditions [6] but during the wine-making process [7] significant changes may also occur.

Several methods have been reported for quantitative analysis of *trans*-resveratrol in wine as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [8] or capillary electrophoresis but liquid chromatography (LC) is the preferred technique for this purpose. UV-vis diode array detector (DAD), fluorescence detector (FD) [9] and mass spectrometry [10] are frequently used for detection.

The aim of this work was to monitor the variation of *trans*-resveratrol content during the winemaking process of Muscatel wines from Setúbal region at different producers. LC was used to separate sample components and, for quantification purposes, fluorescence detection

was chosen as this detection was found to be more sensitive than other detection modes used during the optimization of the analytical method. Mass spectrometry coupled to LC (LC-MS) was used in order to identify this compound in the samples analysed.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Sample preparation

Concentrated samples for analysis by LC-MS were prepared using 10 mL of wine which was extracted four times with 7 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were combined and evaporated to dryness under vacuum. The residue was redissolved in 250  $\mu\text{L}$  of methanol/water (6:4; v/v) [11].

Wine samples and extracts above mentioned were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membranes (Millipore), before analysis by liquid chromatography (LC).

### 2.2. Standard solution

A standard stock solution was prepared by dissolving *trans*-resveratrol in methanol. Different working solutions were prepared for each detection mode: 0.019 to 5.00  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for diode array, 0.075 to 7.50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for fluorescence and 1.2 to 7.5  $\text{mg}/\text{L}$  for electrochemical.

### 2.3. Equipments

Analysis by LC-MS was performed with a Surveyor equipment from Thermo Finnigan. The mass spectrometry system was an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose C.A., USA) equipped with an ESI or APCI sources. The LC-MS system was run by Excalibur version 1.3 software (Thermo Finnigan – Surveyor, San Jose, USA). The analytical column was a RP-18 (100  $\times$  2.1 mm 5  $\mu\text{m}$ ) from Merck with a guard column of the same type. The samples were injected using a 20  $\mu\text{L}$  loop; the separations were carried out with a flow rate of 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  and column temperature of 35°C. The mobile phase consisted of mixture of eluent A: (formic acid 0.5%), eluent B: acetonitrile).

For quantitative analysis, a Surveyor equipment from Thermo Finnigan with a tandem of Uv-vis diode array, a fluorescence (Thermo Finnigan FL 3000) and electrochemical (Dionex, ED40) detectors was used. The data systems used were the Chromquest (Thermo Finnigan) for the diode array detector and the 4880 (Unicam) for the electrochemical and fluorescence detectors. The analytical column was a RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4 mm i.d) from Merck with a guard column of the same type. The samples were injected using a 20  $\mu\text{L}$  loop; the separations were carried out with a flow rate of 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  and column temperature of 35°C. The mobile phase consisted of mixture of eluent A: phosphoric acid 0.1 % and eluent B: phosphoric acid:acetonitrile:water 5:400:595, v/v/v). Diode array detection (DAD) was performed between 200-800 nm. For fluorescence detection the following conditions were used: 300/390 nm ( $\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$ ).

The emission spectra of *trans*-resveratrol was obtained with a spectrofluorometer (SLM Aminco) equipped with a xenon lamp (Muller Elektronik Optic). The excitation wavelength was set at 300, 306 and 310 nm and excitation slits were set to provide 8-nm band passes slit. 1 cm path length quartz cell was used. Data acquisition and analysis of fluorescence spectra were performed with the Model 8100 Spectrofluorometer version 4.20 1998 Spectronic Instruments, Inc.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The identification of *trans*-resveratrol in wines was achieved by LC-APCI-MS by comparison of the retention time and MS<sup>2</sup> fragmentation pattern of ion *m/z* 229 with the results obtained for the pure standard solution analysed in the same conditions (figure 1). Fragments *m/z* 107.0, 118.9, 135.0, 211.2 and 229.3 are present, in both standard and wine, and these results are according to data from literature [12].

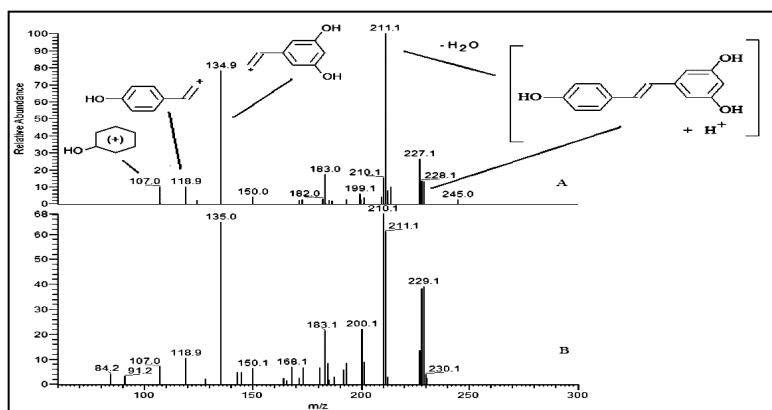


Figure 1 – MS<sup>2</sup> fragmentation of *m/z* 229 for (A) *trans*-resveratrol standard solution (120 mgL<sup>-1</sup>) and (B) extract of Setúbal Muscatel wine

In order to optimize fluorescence detection the excitation and emission spectra of *trans*-resveratrol were determined using eluent A and B as solvent. From spectra obtained the following conditions were chosen in order to perform fluorescence detection: excitation wavelength ( $\lambda_{EX}$ ) at 300 nm and the emission wavelength ( $\lambda_{EM}$ ) at 390 nm.

Detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were estimated considering the lower concentration of *trans*-resveratrol that would give a signal/noise ratio of 3/1 and 10/1 respectively. For fluorescence detection mode, LOD and LOQ were 0.013 and 0.040 mgL<sup>-1</sup> respectively. These values were lower than LOD and LOQ obtained with electrochemical detection 0.340 and 1.04 mgL<sup>-1</sup> respectively and UV-vis, 0.019 and 0.060 mgL<sup>-1</sup>.

Some authors use UV detection to quantify *trans*-resveratrol in wine samples, however chromatograms obtained with this detection mode show there are other wine components eluting with a similar retention time. Fluorescence and electrochemical detection modes are more selective and are than, very useful to analyse these complex samples. In this work fluorescence detection mode was chosen as the method shown to be more sensitive.

Results obtained in analysis of commercial wines and wine samples collected during the vinification process at three representative producers (A, B and C) from the region are presented in table 1 and show that the concentration of *trans*-resveratrol in wine from one producer (A) is lower than the concentration obtained for wines obtained from the other producers. It is also possible to conclude that *trans*-resveratrol content, decreased along the winemaking process. These results are in accordance with published data suggesting that longer maceration periods after alcoholic fermentation do not increase the resveratrol content in wines [1]. At the beginning of the winemaking process differences were already noticed among the samples analysed that could result from the chemical composition of grapes used by producers. These differences could be due to fungal infection, environmental conditions (temperature and humidity) and abiotic stress such as ultraviolet light [7].

**Table 1.** Concentrations (Mean  $\pm$ SD) of *trans*-resveratrol in Muscatel wine samples from Setúbal region ( $\text{mgL}^{-1}$ ) collect in different months (m) corresponding to different stages in vinification process (maceration, maturation and aging) using the fluorescence detector

| Producer | Vinification                                       |  |                         | Commercial        |
|----------|--|--|-------------------------|-------------------|
|          | Maceration   | Maturation   | Aging in wood           |                   |
| A        | 0.147 $\pm$ 0.004 (1 m)<br>0.121 $\pm$ 0.004 (3 m) | 0.108 $\pm$ 0.004 (10m)                              | 0.106 $\pm$ 0.004 (18m) | <LOQ              |
| B        | 0.195 $\pm$ 0.004 (2 m)<br>0.191 $\pm$ 0.004 (3 m) | 0.203 $\pm$ 0.004 (7 m)<br>0.137 $\pm$ 0.004 (20 m)  | _____                   | 0.129 $\pm$ 0.004 |
| C        | 0.248 $\pm$ 0.004 (1 m)<br>0.326 $\pm$ 0.004 (3 m) | 0.360 $\pm$ 0.004 (10 m)<br>0.259 $\pm$ 0.004 (20 m) | _____                   | _____             |

#### 4. CONCLUSIONS

The use of fluorescence detection ( $\lambda_{\text{ex}}= 300 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 390 \text{ nm}$ ) is adequate for the quantification of low concentrations of *trans*-resveratrol in Muscatel Setúbal wines as it allows the quantification of this compound in wines by direct injection without sample pretreatment.

The concentration of *trans*-resveratrol decreases during the winemaking process of the Setúbal Muscatel wine. The *trans*-resveratrol content in these wines analysed ranged from  $0.108 \pm 0.004 \text{ mgL}^{-1}$  (producer A) to  $0.326 \pm 0.004 \text{ mgL}^{-1}$  (producer C).

The results obtained when commercial wines from the same producers were analysed showed that for producer A, the concentration in wine was lower than the LOQ and for producer B the concentration of *trans*-resveratrol was  $0.129 \pm 0.004 \text{ mgL}^{-1}$ .

#### Acknowledgements

The authors thank to:

José Maria da Fonseca, Succs., Adegas Cooperativas de Palmela and Casa Agrícola Horácio Simões for providing samples of Muscatel wines, and also to Dra. Rute Marques and Dra. Helena Lameiro for their help to operate with the spectrofluorometer equipment.

#### References

- [1] Sun B. *et al*, Analytica Chimica Acta 563 (2006) 382-390
- [2] Maria Monagas *et al*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45 (2005) 85–118
- [3] Piñeiro Z. *et al*, Journal of Chromatography A, 1110 (2006) 61-65
- [4] José A.B. Baptista *et al*, Food Research International 34 (2001) 345-355
- [5] Jiménez Sánchez *et al*, Journal of Chromatography A 1074 (2005) 133-138
- [6] M. Abril *et al*, Food Chemistry 92 (2005) 729-736
- [7] O. Gürbüz *et al*, Food Chemistry 100 (2007) 518–525
- [8] Jeandet *et al*, J.Agric. Food Chem. 43 (1995) 316-319
- [9] Vitrac X. *et al*, Analytica Chimica Acta 458 (2002) 103-110
- [10] M.N. Bravo *et al*, Analytica Chimica Acta 563 (2006) 84–92
- [11] Y. Wang *et al*, J.Agric. Food Chem. 50 (2002) 431-435
- [12] D. Callemien *et al*, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 424-429



## REFERENCE MATERIALS AS A KEY ISSUE IN TRACEABILITY CHAIN OF EUROFIR FOOD COMPOSITION DATABANKS

*Coelho, I.; André, C.; Castanheira, I.; Calhau, M.A.*

*Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Lisbon – Portugal*

The main purpose of modern Food Composition Databanks (FCDBs) is to provide qualitative and quantitative information on the chemical composition of foods. This information should be compatible with data collections or sets between countries. Its function is to support clinical practice, research, public health and the food industry at a national and international level over time. These data are based either on laboratory analysis or estimated from appropriate nutrient values. Consequently, circumstances require appropriate methodologies for analytical procedures and compilation activities that guarantee confidence in the values entered into FCDBs. Addressing this issue is one of the objectives of the EU Network of Excellence: European Food Information Resource – NoE EuroFIR.

Initiatives for improving data quality, at EuroFIR, consider Reference Materials (RMs) as a cornerstone for the evaluation of analytical methodologies and compilation of nutrient values. The aim of this paper is to present a preliminary study describing the actual situation and current needs of food matrix RMs. The first survey of quality systems among EuroFIR partners indicated that the majority of laboratories producing analytical data follow a defined system for inclusion of Reference Materials although some gaps were identified. Matrix Reference Materials are needed for macronutrients such as dietary fibre, total fat, ash and moisture, and for micronutrients, such as fatty acids, cis and trans isomers. The main benefits of RMs as a quality tool of analytical procedure or as a criteria for evaluation of data during compilation process are illustrated. The work provides some examples on how these concepts can be applied in selected food groups and nutrients considered as dietary indicators for health monitoring in Europe. The role of RMs in interchange of data at European level is described. The fit for purpose of commercial Reference Materials is discussed in terms of their relevance to data management.

*This work was completed on behalf of the EuroFIR consortium and funded under the EU 6<sup>th</sup> Framework Food Quality and Safety Programme.*



## **6. PROCESSAMENTO, CONSERVAÇÃO, VIDA ÚTIL E CIRCUITOS DE DISTRIBUIÇÃO**

---

### **6.1 Sessão Plenária**

**Novel Technologies for the Thermal Processing of Foods**

### **6.2 Sessão de Comunicações Orais**

### **6.3 Painéis**



# NOVEL TECHNOLOGIES FOR THE THERMAL PROCESSING OF FOODS

*Vicente, A.A.*

IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering,  
Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal  
Phone +351-253 604 419 Fax +351-253 678 986 e-mail: avicente@deb.uminho.pt

**Keywords:** ohmic heating, micro-waves, radio-frequency, induction, infrared

**Abstract:** Heating is probably the oldest means of processing foods and has been used by mankind for millennia. However, the technology used to heat foods in order to process them has had a spectacular evolution during the 20<sup>th</sup> century which has continued until the present time. Technologies such as ohmic heating, dielectric heating (which includes microwave heating and radio frequency heating) and inductive heating have been developed which can replace, at least partially, the traditional heating methods which rely essentially on conductive, convective and radiative heat transfer. They all have a common feature: heat is generated directly inside the food and this has direct implications in terms of both energetic and heating efficiency. Also infrared heating has been developed as a means of heat processing of foods.

These are called novel thermal processing technologies, meaning that the change in temperature is the main processing factor, as opposed to the novel non-thermal processing technologies such as pulsed electric fields, high pressure, pulsed light, ultrasound, gamma radiation, among others, where temperature may also change but is not the major responsible for food processing.

## 1. INTRODUCTION

The following text presents, in general terms, the main novel thermal processing technologies currently available. The main idea is to provide an overview of the field, while showing some particular examples of the research that has been recently conducted.

## 2. OHMIC HEATING (MODERATE ELECTRIC FIELDS)

In ohmic heating (OH) heat is internally generated due to the electrical resistance of foods [1]. Other electrical heating methods can be distinguished from OH as the latter:

- needs electrodes contacting the foods (e.g. in microwave electrodes are absent)
- uses an unrestricted frequency (except for the specially assigned radio or microwave frequency range)

- uses an unrestricted waveform (although typically sinusoidal).

OH has been successfully applied in food processing in the XIX century to pasteurize milk [2]. In 1938 the so-called "Electropure Process" was already used in approximately fifty milk pasteurizers in five US states and served about 50000 consumers [3]. Applications such as this were abandoned due to high processing costs [1] and due to the short supply of inert materials needed for the electrodes [4].

Despite of these early drawbacks research on ohmic applications in fruits, vegetables, meat products and surimi has kept on, mainly in the last two decades.

Aseptic processing is considerably developed in the food industry especially for liquid foods which are processed predominantly by means of heat exchangers. Their application to particulate foods is limited by the time required to ensure the correct processing of the centre of larger particles, often causing overcooking of the surrounding volume. Consequently, product safety is achieved at the expense of quality.

The renewed interest in OH technology is due to the fact that products are of a superior quality to those processed by conventional technologies [5-7]. The main advantages claimed for this technology are uniformity of heating and improvements in quality with minimal structural, nutritional or organoleptic changes [8]. Possible applications include most of the heat treatments such as blanching, evaporation, dehydration, fermentation as well as pasteurization and sterilization.

OH also features some disadvantages, namely those related with the high initial operational costs and the lack of generalized information or validation procedures.

Actually, OH is used industrially in North America, Europe and Asia to produce a variety of high-quality, low and high-acid products containing particulates. A considerable number of additional applications are being developed for this technology as shall be presented in the last part of this section.

Heating is achieved through the application of an electric field to a food with a given electrical conductivity ( $\sigma$ ) by means of direct contact with electrodes. For such process, not only those two variables but also particle orientation and geometry are determinant of the success of the process.

The application of OH for food processing is still not well characterized and not all its potentialities have been fully exploited due to the complexity of the phenomena occurring during OH processing and the complexity of food materials. Novel applications and a deeper knowledge of current applications must be obtained and further research and development work on OH in these areas are essential [9].

## **2.1. Effects on microorganisms**

The main mechanism of microbial inactivation under OH is surely the effect of temperature. However, the destruction of microorganisms by non-thermal effects such as electricity is still not well understood and generates some controversy as little work has been done in this field. The application of an electrical field may induce pore formation in membranes (similar to the electroporation mechanism used to transform cells in molecular biology studies) allowing a faster and efficient transport of the nutrients into the cells thus decreasing lag phase. Studies such as that of Cho *et al.* [10] provide evidence that OH may be useful in the food industry e.g. to shorten the time for processing yogurt and cheese production. The effect of an electric field on the thermal inactivation kinetics of a thermo tolerant, ascospore producing, filamentous fungus, *Byssochlamys fulva*, has been studied. This fungus may also produce patulin, an important mycotoxin. The death kinetics of *B. fulva* in strawberry pulp were determined and the *D* values obtained under OH (3.27 min) were half of those obtained under conventional heating (7.23 min).

## **2.2. Effects on enzymes**

The use of enzymes in the food industry for processing reasons is very widespread. Enzymes may also have negative effects on food quality such as production of off-odours, tastes and altering texture. The effects of OH on enzyme activity have not been investigated extensively. There is a recent study by Castro *et al.* [11] where the effects of OH on the

degradation kinetics of lipoxigenase (LOX), polyphenoloxidase (PPO), pectinase (PEC), alkaline phosphatase (ALP) and  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) have been determined. This study demonstrated that the electric field has an additional effect on LOX and PPO inactivation, where much lower  $D$  values were found as compared to conventional heating, meaning that a shorter treatment is needed to achieve the same inactivation degree, thus reducing negative thermal effects in the other food components. In the case of PEC, ALP and  $\beta$ -GAL the electric field seems not to have an influence in enzyme inactivation kinetics as both conventional heating and OH  $D$  and  $z$  values are identical. The authors hypothesize that the presence of the electric field may disturb the metallic prosthetic groups present on LOX and PPO (and absent in PEC, ALP and  $\beta$ -GAL), thus causing the enhancement of activity loss.

### 2.3. Effects on vitamins

The degradation mechanism of vitamins (such as ascorbic acid) is specific to the particular system in which they are integrated. Using industrial strawberry pulps, Castro *et al.* [12] concluded that the reaction follows first order kinetics for both conventional and OH treatments, being the kinetic parameters identical for both heating processes. The conclusion was that the presence of low intensity electric fields ( $< 20 \text{ V.cm}^{-1}$ ) does not affect the ascorbic acid degradation. Similar conclusions were obtained by Lima [13] for orange juice systems.

## 3. MICROWAVE HEATING

Microwave (MW) technology dates back to the beginning of the 20<sup>th</sup> century but its industrial application has been facing new developments in the past three decades.

In the 90's annual sales in the EUA exceeded 10 million units which translates to a penetration rate in households of over 80 %. The European market presents similar trends.

Microwaves are a form of electromagnetic radiation, characterized by wavelength and frequency.

MW heating has a number of quantitative and qualitative advantages over conventional heating techniques namely:

- Speed
- Uniformity of heating (in some cases this uniformity may be reduced)
- Selective heating (microwaves couple selectively into materials that are more absorptive of the energy; although greater efficiency can be achieved, temperature profiles can develop in multi-component food systems).

Other advantages of MW heating systems, some depending on the application, are that it can be turned on or off instantly, the product can be pasteurized after being packaged, space saving or reduced noise levels. These advantages often yield an increased productivity and/or an improved product quality.

The main disadvantages claimed for this technology is the lack of experimental data needed to model MW heating and the need of engineering intelligence to understand and minimize uneven heating or thermal runaway.

The main applications of MW heating in food processing are: (re)heating, baking and (pre)cooking, meat tempering, blanching, pasteurization and sterilization, drying and freeze-drying.

MW heating involves two distinct mechanisms: dielectric and ionic.

The dielectric heating is mainly due to the presence of water. Due to their dipolar nature, water molecules try to follow the electric field associated with electromagnetic radiation as it oscillates at the very high frequencies listed and such oscillations produce heat.

The dielectric properties dictate, to a large extent, the behaviour of materials when submitted to MW field and it is, therefore, fundamental to characterize it.

The second major mechanism of heating with microwaves is through the oscillatory migration of ions in the food that generates heat under the influence of the oscillating electric field. The migration of ions towards oppositely charged regions results in multiple collisions and disruption of hydrogen bonds with water, both generating heat.

The MW heating process is affected by a number of parameters. Some of these critical process factors are MW frequency, moisture content, temperature, product parameters (including mass, density, geometry), and specific heat. The spatial distribution of MW absorption is affected by those parameters meaning that different heating rates (uneven heating) will be observed. Being so, different microbial inactivation extents will occur within the food product and may jeopardize food safety.

The main obstacles to industrial setting up of MW heating processes are the difficulties in controlling the process and the high energy costs associated with this technology. The changes of dielectric properties of food products during the heating processes are not yet fully understood or modelled and, consequently, the validation of the processes has to be done almost individually for each food product, slowing down the dissemination of MW industrial lines.

### **3.1. Microbial inactivation**

Several studies report the inactivation kinetics of microorganisms in food systems when using MW and conventional heating methods. However, the comparison of the two methods is not very accurate either by lack of details of the methodology or due to the different techniques used for temperature monitoring [14]. MW heating is often reported to cause non-uniform heating. This fact leads to survival of food borne pathogens, including *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in cold spots which, in this case, are not the centre of the food. Being so, monitoring the internal temperature that would normally be lethal, may not be sufficient to ensure microbial food safety [15].

The inactivation curves for microorganisms using MW heating are similar to those obtained using conventional heating methods. Despite of this fact, an additional killing factor due to non-thermal effects was also discussed. Four major theories were proposed to explain non-thermal inactivation by microwaves: selective heating, electroporation, cell membrane rupture, and magnetic field coupling [16]. The non-thermal effect is still not well established but is currently accepted that MW energy may complement or magnify thermal effects by causing non-lethal injuries to the cells. The major drawbacks of MW heating are its non-uniform heating and unpredictability of cold spots which may put at risk safety of the food.

## **4. RADIO FREQUENCY HEATING**

Radio frequency heating (RF) heating involves the transfer of electromagnetic energy directly into the product, therefore inducing volumetric heating due to frictional interaction between molecules [17]. In RF heating the food is placed between two capacitor plates, where it plays the role of a dielectric to which a high frequency alternating electric field is applied. Such field will force polar molecules (e.g. water) to constantly realign themselves with the electric field. This molecular movement is very fast due to the high frequency of



the field and will provoke generation of heat within the food by energy dissipation caused by molecular friction.

RF waves (as well as microwaves) are both within the radar range and this strongly limits the frequencies which can be used for applications other than communications. The fact that the wavelength at radio frequencies (e.g. 11 m at 27.12 MHz) is substantially greater than at microwave frequencies (e.g. 12 cm at 2450 MHz) justifies the significant advantages of RF over microwaves, especially in the case of food processing applications [18].

As compared with conventional heat processing technologies, RF heating presents similar advantages to ohmic and microwave heating which are essentially due to the generation of heat throughout the volume of the material to be processed. However, there are some specific advantages of RF over those alternative volumetric technologies, namely [18]:

- there is no need for electrodes contacting the food (in contrast with e.g. ohmic heating), allowing RF to be easily applied to both solid and liquid foods;
- due to the longer wavelength of RF, its power will penetrate more deeply in the foods as compared to microwave power;
- the construction of large RF heating systems is simpler than their microwave counterparts, and their application to continuous processes is straightforward; it is a technology particularly suited to large industrial applications.

RF's main disadvantages are [18,19]:

- the higher equipment and operating costs for an equivalent power output when compared to conventional heating systems and also to ohmic heating;
- the reduced power density when compared to microwave heating, meaning that larger RF heating systems are needed for the same power rating and also that slower heating rates are achieved with RF as compared to microwaves;
- the so far limited research efforts regarding e.g. the determination of food RF dielectric properties.

The relevant properties in RF heating are the relative dielectric constant ( $\epsilon_r'$ ), the relative dielectric loss factor ( $\epsilon_r''$ ) and the electrical conductivity ( $\sigma$ ), which are the so-called dielectric properties. These properties affect RF heating e.g. in terms of their influence on temperature increase [20]. RF is also influenced by means of the penetration depth ( $d$ ). The dielectric properties of foods are influenced mainly by frequency, temperature, water content and chemical composition [17].

#### **4.1. The effects of radio frequency heating**

Much in the same way as with the determination of dielectric properties, the effects of RF heating in microorganisms and food constituents (e.g. vitamins) have been scarcely studied (in comparison, for microwave heating there is much more information available) [21].

The possibility of a non-thermal effect of RF on the death kinetics of microorganisms has been discussed for about 60 years, and while some authors claim inactivation of microorganisms due to the non-thermal effect of RF (see, e.g., [22,23]), others claim precisely the contrary (see, e.g., [24-26]). Although no consensual results have been published so far, the clear trend is to consider that if a non-thermal effect of RF on microorganisms exists, it is negligible for the most usual operation conditions.

There is a significant amount of publications, some dating back from the 1940's, where the use of RF is described for various applications, including blanching, pasteurization/sterilization, thawing, drying, heating of bread/baking, meat processing, among others.

## 5. INFRARED HEATING

The applications for infrared (IR) radiation are very wide and include medical, dye, automobile and paper industries, among others. The discovery of this type of radiation dates back to 1800 when Sir William Herschel was attempting to determine the part of the visible spectrum, with the minimum associated heat, during astronomical observations.

The use of this technology in the food industry was first reported in the 50's for drying processes.

IR heating is the transfer of thermal energy in the form of electromagnetic waves. Within the IR spectra three different regions can be distinguished, depending on the wavelength: short waves (0.7 – 2.0  $\mu\text{m}$ ) that appear when temperatures are above 1000 °C; medium waves (2.0 – 4.0  $\mu\text{m}$ ) when temperatures range from 400 to 1000 °C and long waves (4.0  $\mu\text{m}$  – 1 mm), when temperatures are below 400 °C. The medium to long range wavelengths appeared to be the most advantageous to industrial applications since almost all materials to be heated or dried provide maximum absorption in the 3 to 10 mm region. However, new applications using short waves have been arising.

IR heating presents several advantages over conventional heating methods, some of them similar to the other types of electromagnetic heating, namely:

- Instant heat – there is no need for heat build-up because electric IR systems produce heat instantly.
- Reduced operating costs – depending on the insulation, type of construction and other factors, the energy savings can reach 50 %. Moreover, maintenance operations are restricted to reflectors cleaning and changing of the heat source.
- Clean and safe – there is no production of by-products and operating the IR equipment is a low risk task.
- Zone control – the IR energy does not propagate, it is absorbed only at the area it is directed into. This allows differentiating heating in nearby zones. Moreover, IR is not absorbed by the air so the surrounding air does not heat up.

IR radiation is electromagnetic radiation which is generated in a hot source (quartz lamp, quartz tube, or metal rod) by vibration and rotation of molecules. Heat is generated by the absorption of the radiating energy.

There are some critical factors in IR heating which must be considered; these are [27,28]: radiator temperature, radiator efficiency, IR reflection/absorption properties and IR penetration properties. Being so, the rate of heat transfer depends on the surface temperature of the heating and receiving materials, the surface properties of the two materials and the shape of the emitting and receiving bodies.

IR heating has been used for heating and cooking of soybeans, cereal grains, cocoa beans, nut, some ready to eat products, braising meat and frying and drying apple slices [29,30]. Drying of seaweed, vegetables, fish flakes and pasta is also done in tunnel IR dryers.

The use of IR technology in the food industry is still in the first stages of development and future trends will certainly be focused on:

- process control and equipment development;
- understanding the interactions between heating process and product's properties (organoleptic and nutritional);
- expanding the areas of application of IR heating.

## References

- [1] – de Alwis, A. A. P., Fryer, P. J. *A finite-element analysis of heat generation and transfer during OH of food*, Chem. Eng. Sci. **45** (1990) 1547-1559.
- [2] – Getchel, B. E. *Electric pasteurization of milk*, Agric. Eng. **16** (1935) 408-410.
- [3] – Moses, B. D. *Electric pasteurization of milk*, Agriculture Eng. **19** (1938) 525-526.
- [4] – Mizrahi, S., Kopelman, I., Perlaman, J. *Blanching by electroconductive heating*, J. Food Technol. **10** (1975) 281-288.
- [5] – Castro, I., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. *The influence of field strength, sugar and solid content on electrical conductivity of strawberry products*, J. Food Proc. Eng. **26** (2003) 17-29.
- [6] – Kim, H. J., Choi, Y. M., Yang, T. C. S., Taub, I. A., Tempest, P., Skudder, P., Tucker, G., Parrott D. L. *Validation of OH for quality enhancement of food products*, Food Technol. **50** (1996) 253-261.
- [7] – Parrott, D. L. *Use of OH for aseptic processing of food particulates*, Food Technol. **45** (1992) 68-72.
- [8] – Skudder, P. J. *OH in food processing*. Asian Food J., **4** (1989) 10-11.
- [9] – Vicente, A. A., Castro, I., Teixeira, J.A. *Ohmic heating for food processing*. In: *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues*, Da-Wen Sun (ed.), 419-458, Taylor and Francis, Ltd, New York (2005).
- [10] – Cho, H. Y., Yousef, A. E., Sastry, S. K. *Growth kinetics of Lactobacillus acidophilus under ohmic heating*. Biotechnol. Bioeng. **49** (1996) 334-340.
- [11] – Castro, I., Macedo, B., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. *The Effect of Electric Field on Important Food-processing Enzymes: Comparison of Inactivation Kinetics under Conventional and Ohmic Heating*, J. Food Sci., **69** (2004a) 696-701.
- [12] – Castro, I., Teixeira, J. A., Salengke, S., Sastry, S. K., Vicente, A. A. *Ohmic heating of strawberry products: electrical conductivity measurements and degradation kinetics*, Innovative Food Sci. Emerging Technol. **5** (2004b), 27-36.
- [13] – Lima, M. *Ascorbic acid degradation kinetics and mass transfer effects in biological tissue during ohmic heating*. PhD dissertation, Ohio State University, Columbus (1996).
- [14] – Heddleson, R. A., Doores, S. *Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens - a review*, J. Food Protection **57** (1994) 1025-1037.
- [15] – Schnepf, M., Barbeau, W.E.X. *Survival of Salmonella typhimurium in roasting chickens cooked in a microwave, convention microwave and conventional electric oven*, J. Food Safety **9** (2001) 245-252.
- [16] – Kozempel, M. F., Annous, B. A., Cook, R. D., Scullen, O. J., Whiting, R. C. *Inactivation of microorganisms with microwaves at reduced temperatures*, J. Food Protect. **61** (1998) 582-585.
- [17] – Piyasena, P., Dussault, C., Koutchma, T., Ramaswamy, H. S., Awuah, G. B. *Radio frequency heating of foods: principles, applications and related properties – a review*, Critical Rev. Food Sci. Nutrition **43** (2003) 587-606.
- [18] – Rowley, A. T. *Radio frequency heating*. In: *Thermal Technologies in Food Processing*, P. S. Richardson (ed.). Woodhead Publishing, Ltd, London (2001)
- [19] – Ohlsson, T. *Minimal processing of foods with electric heating methods*, In: *Processing Foods: Quality Optimisation and Process Assessment*, F. A. R. Oliveira, J. C. Oliveira, M. E. Hendrickx, D. Knorr, L. Gorris (eds.) 97-105, CRC Press, Boca Raton (1999).
- [20] – Orfeuil, M. *Electric process heating: technologies/equipment/applications*, Battelle Press, Columbus (1987).
- [21] – Oberndorfer, C., Pawelzik, E., Lücke, W. *Prospects for the application of dielectric heating processes in the pre-treatment of oilseeds*, European J. Lipid Sci. Technol., **102** (2000) 487-493.
- [22] – Fleming, H. *Effect of high frequency fields on microorganisms*, Electrical Eng. **63** (1944) 18-21.
- [23] – Nyrop, J. E. *A specific effect of high-frequency electric currents on biological objects*, Nature **157** (1946) 51.

- [24] – Geveke, D. J., Kozempel, M., Scullen, O. J., Brunkhorst, C. *Radio frequency energy effects on microorganisms in foods*, Innovative Food Sci. Emerging Technol. **3** (2002) 133-138.
- [25] – Ingram, M., Page, L. J. *The survival of microbes in modulated high-frequency voltage fields*. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. **16** (1953) 69-87.
- [26] – Ponne, C. T., Balk, M., Hancioglu, O., Gorris, L. G. M. *Effect of radio frequency energy on biological membranes and microorganisms*, Lebensm. Wiss. Technologie, **29** (1996) 41-48.
- [27] – Ginzburg, A. S. *Application of infrared radiation in food processing*, Chemical and Process Engineering Series, Leonard Hill Books, London (1969).
- [28] – Hallström, B., Skjöldebrand, C., Tragradh, C. *Heat transfer and food products*. Elsevier Applied Science, London (1988).
- [29] – Nowak, D., Lewicki, P. *Infrared drying of apple slices*, Innovative Food Sci. Emerging Technol. **5** (2004) 353-360.
- [30] – Ratti, C., Mujumdar, A. S. *Infrared drying*. In: *Handbook of Industrial Drying*, vol. 1, A. S. Mujumdar (ed.) 567-588 (1995).

## STUDY OF THE PUMPKIN CONVECTIVE DRYING

*Pinho, S.M.; Guiné, R.P.F.\*; Barroca, M.J.*

Department of Food Engineering, ESAV, Polytechnic Institute of Viseu  
Quinta da Alagoa. Estrada de Nelas. Ranhados. 3500-606 Viseu, Portugal.

Telef: +351232480600, Fax: +232426536

\*E-mail: raquelguine@esav.ipv.pt

The pumpkin is a squash fruit, most commonly orange in colour when ripe and is appreciated when cooked, pureed, used in soups, breads, and many other dishes. Its dried form is an alternative to fresh pumpkin which allows its use during off-season. However, the drying process can have a strong impact on the quality of the dehydrated product.

The aim of this work is to analyse the effect of convective drying on the nutritional properties of fresh and dried pumpkin (*Cucurbita máxima*). The samples were dried using circular slices in a ventilated chamber for different temperature, between 30 to 70°C.

The results enable us to conclude that the fresh pumpkin has a low content of fat and a high level of water, sugars, protein and crude fiber. This chemical composition associated with its antioxidant activity allows the pumpkin to have an excellent source of nutritive components and an important health-protecting factor.

In addition, it is also possible to conclude that, apparently, the convective drying process has no effect on the nutritional characteristics of the pumpkin, except on sugars and acidity.

The influence of the operating condition (the temperature) on the drying kinetics was also analysed. The results show that the increase on the operating temperature strongly accelerates the drying process and a constant rate period is not observed. However, in the range of 30 to 70°C it was observed that there is a similar kinetic behaviour for all the values of this operating condition. The experimental data for the moisture ratio content with time was fitted to eight different models, and the two that showed a better performance were the Page and Wang & Singh models.



# INFLUENCE OF SLAUGHTER SEASON ON MAJOR LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANT VITAMINS IN CARNALENTEJANA AND MERTOLENGA PDO-BEEF AS WELL AS IN AROUQUESA AND BARROSÃ PDO-VEAL

*Quaresma*<sup>1,\*</sup>, M.A.G.; *Rodrigues*<sup>1</sup>, I.T.; *Alfaia*<sup>1</sup>, C.; *Bessa*<sup>2</sup>, R.J.B.; *Prates*<sup>1</sup>, J.A.M.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária-CIISA, Avenida da Universidade Técnica, Pólo Universitário do Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal. Email: \*mquaresma@fmv.utl.pt  
<sup>2</sup> Estação Zootécnica Nacional - INIAP, Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.

## Abstract

Meat production systems, certified under the Portuguese PDO specifications, are based on traditional rearing methods, and the use of local agriculture surplus to supplement animals' diet. PDO-meat quality has some resemblance with organic meat, sharing a healthier fatty acid profile than meat produced by intensive production systems. Nevertheless, their higher contents of PUFA and heme iron, makes meat more susceptible to lipid oxidation, threatening the health benefits associated with higher PUFA content. Therefore, levels of meat antioxidants are of relevance, together they prevent meat oxidation and preserve its nutritional value. The aim of this study was to assess seasonal variation of major lipid-soluble antioxidant vitamins in four PDO-meats.

Alentejana and Mertolenga young bulls and Arouquesa and Barrosã calves raised according to the PDO specifications and slaughtered in late spring and early autumn periods were randomly selected for sampling. Meat samples from the ribeye (LT) and from the distal portion of semitendinosus muscle (ST) were collected 2-3 days after slaughter (+4°C). The meat vitamin E isomers and  $\beta$ -carotene were quantified simultaneously by normal-phase HPLC, using fluorescence and UV-visible photodiode array detectors in tandem. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test ( $P < 0.05$ ).

Among all four analyzed breeds, Barrosã veal is the only one with no seasonality effects for any of the analyzed vitamins. Beef from Alentejana and Mertolenga breeds share a common pattern of seasonality, characterized by a significant higher spring levels of  $\beta$ -carotene in both muscles, but no seasonal effect for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols. Arouquesa veal shows seasonal influence only in  $\gamma$ -tocopherol, which is higher in autumn.

The study has shown that despite of some evidences of seasonality influence on meat antioxidant vitamins ( $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene),  $\alpha$ -tocopherol, vitamin E major isomer in meat and the one with highest biological antioxidant activity, showed to seasonal variation in all four PDO-meats, which is an assurance of meat antioxidant potential throughout the year.

**Keywords:** PDO-meat, alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, beta-carotene, lipid oxidation

## 1. Introduction

Meat consumption is a tradition in human dietary habits and an important source of high biological value protein and micronutrients, such as vitamins A, B6, B12, D, E, iron, zinc, selenium (Biesalski, 2005; Williamson et al., 2005). Despite traditional habits, meat consumption, in most industrialized countries, contributes to an excessive intake of total fat and saturated fatty acids, which should not exceed 15-30% and 10% of calories, respectively (World Health Organisation, 2003). Dietary intake of increased amounts of saturated fats has been associated with an increased risk of obesity, hypercholesterolemia and cancer (Wood et

al., 2004). Moreover, beef obtained from grain-fed systems contributes to the low ratio of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids (PUFA/SFA) and to the higher ratio of n-6/n-3 fatty acids, which are far from optimal in western diets (Wood et al., 2004). Both ratios are considered harmful for human health and have been correlated with cardiovascular diseases, cancer, inflammatory and autoimmune diseases (Simopoulos, 2002).

Nowadays, red meat is seen not only as a health detrimental factor, but also as a source of lipidic health promoting compounds (monounsaturated, polyunsaturated fatty acids and CLA). The red meat valuable or detrimental health potential is dependent of the ratio between beneficial and detrimental fatty acids, which are linked with animal's nutritional management.

Consumers' knowledge of the correlation between diet and health is changing their consumer habits. Furthermore, consumers are also aware of the complexity of meat quality and do not satisfy solely with hygienic and organoleptic characteristics of meat, which were of major importance in a near past (Anderson et al., 2005). Consumers growing health concerns have led to a higher demand for lean meat (low calories) and healthier meat (lower cholesterol and lower n-6/n-3 ratio and higher PUFA/SFA) (MacRae et al., 2005).

Consumers health concerns has increased their nutritional standards and their interest on meat production systems and animal welfare, which has changed consumers preferences towards organic and traditional production systems. These systems share some similarities with Protected Designation of Origin (PDO) production systems, including a common feeding management system, based on extensive pasturage feeding on natural forage and a low stocking rate. Portuguese PDO-meats are obtained from pure breed animals of Portuguese autochthonous breeds, with a traditional feeding management based on pasture in a low stocking rate and the use of local agricultural surplus in a supplementation manner.

Beef production systems based on pasture feeding and traditional practices respect the physiological and behavioral needs of cattle and provide them good welfare, without the risk of metabolic and feed-related disorders, commonly associated with the intensive feeding systems (Nielsen and Thamsborg, 2005). These pasture-fed animals are a healthier source of meat to human consumption thanks to: 1) higher ratio of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids (PUFA/SFA); 2) lower ratio of n-6/n-3 fatty acids; 3) increased contents of conjugated linoleic acid (CLA). Therefore, beef obtained from pasture-fed cattle has a higher nutritional value and nutraceutic potential than beef obtained from grain-fed cattle (Descalzo et al., 2005; Alfaia et al., 2006). Regardless of PDO-meat increased nutritional and nutraceutic quality, their superior contents of unsaturated fatty acids increases their susceptibility to lipid oxidation (Yang et al., 2002). Lipid oxidation is the primary cause of quality deterioration in muscle foods (Buckley et al., 1995; Monahan, 2000). Lipid oxidation is responsible for quality loss of several important meat characteristics including colour (prime attribute influencing consumers' choice on the meat market), flavour, texture and nutritive value (Faustman & Cassens, 1990a, Gatelier et al., 2005) and is also the major cause of quality deterioration apart from microbial spoilage (Buckley et al., 1995; Monahan, 2000).

For the health claim benefits, beef and veal should provide increased levels of polyunsaturated fatty acids, increased ratio of n-3 fatty acids and CLA. However, the oxidative stability of this meat is difficult to assure and requires higher amounts of antioxidants and a constant level of antioxidants throughout the year.

Natural pasture is a natural source of potent antioxidant vitamins as Vitamin E (alpha- and gamma-tocopherol), together with beta-carotene, a pro-vitamin A compound. These are the major lipid-soluble antioxidants present in meat (Kerry et al., 2000), playing an important role in controlling lipid oxidation. However, there is no body reserves of vitamin E and their contents in grazing ruminants are expected to reflect the variability of pasture biomass and



respective quality, which is highly dependent on cultural practices, season and geographical factors (Moloney et al., 2001).

The aim of this study was to assess seasonal variation of major lipid-soluble antioxidant vitamins (alpha- and gamma-tocopherol and beta-carotene) in four of the most important autochthonous PDO-meats (Alentejana, Mertolenga, Arouquesa and Barrosã).

## 2. MATERIALS AND METHODS

Autochthonous purebred young bulls of Alentejana (autumn n=15, 21.3±2.2 months of age and 387.3±38.5 kg of carcass weight; spring n=16, 16.7±1.7 months of age and 346.9±21.9 kg of carcass weight) and Mertolenga (autumn n=14, 20.4±2.9 months of age and 258.1±35.0 kg of carcass weight; spring n=15, 20.8±4.2 months of age and 260.3±44.6 kg of carcass weight) breed and purebred calves of Barrosã (autumn n=17, 7.7±0.7 months of age and 207.5±24.3 kg of live weight; spring n=10, 8.2±0.8 months of age and 247±43 kg of live weight) and Arouquesa (autumn n=13, 7.8±1.6 months of age and 203.4±36.8 kg of live weight; spring n=19, 7.9±1.4 months of age and 207.8±56.2 kg of live weight) breed, raised under traditional production systems in agreement with all the specifications established by each of PDO-meats certification systems were randomly selected for sampling after slaughter in October 2003 (early autumn sampling) or June 2004 (late spring sampling).

Meat samples taken from the ribeye (LT; T1-T3 of longissimus thoracis muscle) and from the distal portion of semitendinosus muscle (ST) were collected 2-3 days after slaughter (+1°C) of Alentejana and Mertolenga young bulls and Arouquesa and Barrosã calves. All meat samples were ground using a food processor (3 × 5 s), vacuum packed and stored at -80° C until analysis.

Vitamin E isomers and β-carotene were simultaneously quantified by normal-phase HPLC, using fluorescence (tocopherols) and UV-visible photodiode array (beta-carotene) detections in tandem, as described by Prates et al. (2006).

Statistical treatment of data was conducted within the same breed and muscle and between seasons by Mann-Whitney at a significance level of 5% (H0: p<0.05), using the one-way ANOVA procedure of Statistix for Windows.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Among the four analyzed meats, Barrosã veal was the only with no apparent seasonality in all analyzed lipidsoluble antioxidants (p>0,05; table 1). Alentejana and Mertolenga beef showed a similar pattern of seasonality, characterized by significant lower amounts of β-carotene in autumn (table 1). Arouquesa veal was also influenced by seasonality, showing significant higher contents of γ-tocopherol in autumn (table 1). Differences between breeds can be imputed to differences in geographic edafoclimatic conditions and nutritional management systems.

Barrosã stability in major lipidsoluble antioxidant vitamins during the year may outcome from the good edafoclimatic conditions that provide abundance of water and permanent pasture in the high-lands of Minho, where the breed is raised during the summer period.

Arouquesa veal comprises the highest contents of α-tocopherol and β-carotene, both without sazonality effect, and it is the one with major intramuscular fat. Arouquesa veal displays higher contents of γ-tocopherol in autumn, which should be associated with grain supplementation, as maize, naturally rich in γ-tocopherol (McDonald, 2002).

Alentejana and Mertolenga breeds are raised in similar areas of Alentejo, with analogous nutritional management, their lower contents of β-carotene in autumn are the consequence of water deprivation to sustain green forage during the summer period. The Alentejo, southern

and inner province of the Portuguese territory, is characterized by a Mediterranean climate with a hot and dry summer period.

In an overall comparison of our data with other studies, in which different production systems were analyzed in a controlled experimental manner, it was possible to understand the underlying nutrition of PDO production systems. Arouquesa veal  $\alpha$ -tocopherol values are similar or a little higher than those obtained on pasture-fed cattle (Eikeleboom et al., 2000; Yang et al 2002a and 2002b; Descalzo et al., 2005). Mertolenga and Alentejana beef as well as Barrosã veal have  $\alpha$ -tocopherol contents higher than those found in meat obtained from grain-fed production systems but lower than those from pasture-fed systems (Eikeleboom et al., 2000; Yang et al 2002a and 2002b; Descalzo et al., 2005). On the other hand, the comparison  $\beta$ -carotene contents obtained in our study with other studies, shows that Arouquesa veal contents of  $\beta$ -carotene are similar to those obtain in pasture-fed production systems, while the Mertolenga and Alentejana beef as well as Barrosã veal have  $\beta$ -carotene contents in-between the grain-fed and pasture-fed production systems (Yang et al., 2002b; Descalzo et al., 2005).

#### 4. CONCLUSIONS

The assessment of seasonality in these PDO-meats has shown that Barrosã PDO-veal is the only one that is not influenced by seasonal factors, proving veal with constant antioxidant potential.

Nevertheless, the overall analysis and comparison with the results of other studies has also allowed us to say that: 1) Arouquesa PDO-veal antioxidant vitamins are in agreement with a superior antioxidant potential. The veal higher amounts of both  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene are consistent with a superior nutritional management, based mostly on quality forage; 2) Barrosã PDO-veal as well as Alentejana and Mertolenga PDO-beef present medium amounts of major antioxidant vitamins,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene, their amounts are superior to those from grain-fed and lower than those from pasture-fed production systems, which is consistent with a mixed production system at different degrees.

#### Acknowledgements

Financial support (CIISA/2002/52, CIISA/2005/76) is acknowledged.

Sampling and logistic assistance (Dr. Luís Bagalho from Carnalentejana, Eng. Roberto from Montado Alentejano, Sr. Henrique from ANCRA, Dr. João Paulo from CAPOLIB) are also acknowledged.

#### References

Alfaia, C. P. M., Ribeiro, V. S., Lourenço, M. A., Quaresma, M. A., Martins, S. I., Portugal, A. P., Fontes, C. M. G. A., Bessa, R. J. B., Castro, M. F., & Prates, J. A. M. 2006. Fatty acid composition, conjugated linoleic acid isomers and cholesterol in beef from crossbred young bulls intensively produced and from Alentejana purebred young bulls reared according to Carnalentejana-PDO specifications. *Meat Science*, 72, 425-436.

Biesalski, H.-K. 2005. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70(3), 509–524.

- Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Gray, J. L. 1995. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal of Animal Science*, 73, 3122-3130.
- Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A., Josifovich, J.A. 2005. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* 70 (2005) 35–44.
- Eikelenboom, G., Hoving-Bolink, A.H., Kluitman, I., Houben J.H., Klont, R.E. 2000 Effect of dietary vitamin E supplementation on beef colour stability. *Meat Science* 54 (2000) 17-22.
- Faustman C. and Cassens R.G. 1990. The biochemical basis for meat discolouration in fresh meat : a review, *Journal of Muscle Foods* 1 pp. 217–243.
- Gatellier, P., Mercier, Y., Juin, H., & Renerre, M. 2005. Effect of finishing mode (pasture- or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Science*, 69, 175–186.
- Kerry, J.; Buckley, D.; Morrissey, P. 2000. Improvement of oxidative stability of beef and lamb with vitamin E. In *Antioxidants in Muscle Foods* (pp. 229-262). NY:Wiley-Interscience.
- MacRae, J., O'Reilly, L., Morgan, P. 2005. Desirable characteristics of animal products from a human health perspective. *Livestock Production Science* 94 (2005) 95–103.
- Moloney, A. P., Mooney, M. T., Kerry, J. P., & Troy, D. J. 2001. Producing tender and flavoursome beef with enhanced nutritional characteristics. *Proceedings of Nutrition Society*, 60, 221-229.
- Monahan, F. J. 2000. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. Lopez-Bote, *Antioxidants in Muscle Foods* (pp. 3-23). New York: Wiley-Interscience.
- Nielsen, B.K., Thamsborg, S.M. 2005. Welfare, health and product quality in organic beef production: a Danish perspective. *Livestock Production Science* (In Press).
- Mestre Prates, Mário A. Gonçalves Quaresma, Rui J. Branquinho Bessa, Carlos M.G. Andrade Fontes, Cristina M.P. Mateus Alfaia 2006. Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and  $\beta$ -carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry* 94 (2006) 469–477.
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Williamson, C. S., Foster, R. K., Stanner, S. A., & Buttriss, J. L. 2005. Red meat in the diet. *British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin*, 30, 323–335.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, P. R., & Enser, M. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66(1), 21-32.
- World Health Organization 2003. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series n° 916. Geneva: World Health Organization.
- Yang, A., Lanari, M. C., Brewster, M. J., & Tume, R. K. 2002a. Lipid stability and meat colour of beef from pasture- and grain-fed cattle with or without vitamin E supplementation. *Meat Science*,

60(1), 41–50.

Yang, A., Brewster, M. J., Lanari, M. C., & Tume, R. K. 2002b. Effect of vitamin E supplementation on  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Science*, 60, 35-40.

Table 1 – Antioxidant vitamins contents variation between the spring and autumn periods in longissimus thoracis (LT) and emitendinosus (ST) muscles from Alentejana and Mertolenga beef and Arouquesa and Barrosã veal

|                                  | Alentejana                   |                              | Mertolenga                   |                              | Arouquesa                    |                              | Barrosã         |                 |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                  | Autumn                       | Spring                       | Autumn                       | Spring                       | Autumn                       | Spring                       | Autumn*         | Spring          |
| <b>n</b>                         | <b>15</b>                    | <b>16</b>                    | <b>14</b>                    | <b>15</b>                    | <b>13</b>                    | <b>19</b>                    | <b>17</b>       | <b>10</b>       |
| <b>Longissimus thoracis (LT)</b> |                              |                              |                              |                              |                              |                              |                 |                 |
| <b><math>\alpha</math>-TF</b>    | 2.26 $\pm$ 1.43              | 2.09 $\pm$ 0.69              | 3.55 $\pm$ 1.69              | 4.62 $\pm$ 2.32              | 6.81 $\pm$ 2.50              | 5.51 $\pm$ 1.51              | 3.92 $\pm$ 1.11 | 3.67 $\pm$ 0.77 |
| <b><math>\gamma</math>-TF</b>    | 0.19 $\pm$ 0.04              | 0.17 $\pm$ 0.03              | 0.14 $\pm$ 0.07              | 0.13 $\pm$ 0.03              | 0.15 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> | 0.07 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.15 $\pm$ 0.08 | 0.16 $\pm$ 0.07 |
| <b><math>\beta</math>-CT</b>     | 0.04 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 0.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> | 0.04 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 0.10 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> | 0.28 $\pm$ 0.21              | 0.31 $\pm$ 0.11              | 0.09 $\pm$ 0.03 | 0.11 $\pm$ 0.06 |
| <b>Semitendinosus (ST)</b>       |                              |                              |                              |                              |                              |                              |                 |                 |
| <b><math>\alpha</math>-TF</b>    | 1.94 $\pm$ 1.35              | 1.40 $\pm$ 0.34              | 3.20 $\pm$ 1.26              | 3.95 $\pm$ 1.37              | 5.27 $\pm$ 2.13              | 4.60 $\pm$ 1.45              | 3.56 $\pm$ 1.32 | 2.79 $\pm$ 0.38 |
| <b><math>\gamma</math>-TF</b>    | 0.16 $\pm$ 0.05              | 0.13 $\pm$ 0.02              | 0.12 $\pm$ 0.08              | 0.12 $\pm$ 0.03              | 0.12 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup> | 0.07 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.14 $\pm$ 0.06 | 0.13 $\pm$ 0.05 |
| <b><math>\beta</math>-CT</b>     | 0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 0.05 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 0.07 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> | 0.20 $\pm$ 0.12              | 0.27 $\pm$ 0.08              | 0.08 $\pm$ 0.03 | 0.06 $\pm$ 0.07 |

Different letters within the same breed and muscle are significantly different (p<0.05)

\* as presented by Prates et al., 2006

# STUDY OF THE EFFECT OF NON-THERMAL TREATMENTS ON THE SAFETY OF SOME FRUITS AND VEGETABLES

Alexandre, E.M.C.; Santos, D.M.; Fundo, J.; Brandão, T.R.S.; Silva, C.L.M.\*

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa  
Rua Dr. António Bernardino de Almeida  
4200-072 Porto, Portugal

\*Phone: +351-225580058 Fax: +351-225090351 e-mail: [clsilva@esb.ucp.pt](mailto:clsilva@esb.ucp.pt)

**Keywords:** fruits and vegetables, safety, non-thermal treatments

## ABSTRACT

Thermal treatments, when conveniently applied, are efficient in reducing microbial load of fruits and vegetables. However, the negative impact of heat, especially at food texture level, makes non-thermal treatments promising technologies as minimal food processes.

The objective of this work was to study the effect of ultrasonication, and its combination with a milder heat treatment (thermosonication), UV-C radiation, and ozonation on the safety of strawberries (*Fragaria ananassa*), watercress (*Nasturtium officinale*) and red bell peppers (*Capsicum annuum*, L.). Results were compared to water-washings, performed as control.

For strawberries and watercress, safety was assessed in terms of total mesophiles and coliforms, respectively (endogenous flora). In red bell peppers, *Listeria innocua* was enumerated (artificial inoculation).

Results showed that UV-C radiation was less efficient than water-washings at 15 °C, for all microorganisms/products tested.

Ozone allowed, in average, 1 log-cycle reduction for mesophiles and coliforms, and 2 log-cycles reduction for *Listeria innocua* (higher than the values obtained by water-washings at 15 °C).

Ultrasonication treatments were equivalent to water-washings at the same temperatures. The temperature had the major effect. For 50 °C, 2 and 3 log-reductions were observed, respectively, for *Listeria innocua*/red bell pepper and coliforms/watercress. For 65 °C, reductions achieved 6 to 7 log-cycles. Mesophiles/strawberries were more heat resistant (2 log-reductions were obtained at 65 °C).

## 1. INTRODUCTION

The most common thermal technologies used to reduce the microbial load in food products are pasteurization and sterilization treatments. However, temperature has a negative impact at food textural level, and some nutritional contents may also suffer degradation.

Traditionally, fresh fruits and vegetables are washed with some chemical agents, such as, chlorine, hydrogen peroxide and acetic acid solutions. The efficacy of those treatments rounds 2-3 log reductions of microbial content [1, 2, 3], which may not be efficient in cases of high initial contaminations.

New non-thermal treatments have been developed aiming at reducing pernicious effects of thermal processes, by preserving quality and nutritional attributes and decreasing the microbial load [1]. Ultrasonication and its combination with temperature (i.e. thermosonication), ultraviolet radiation and ozonation are examples of innovative technologies applied to fruits and vegetables [1, 4]. The treatment efficiency in reducing

microbial contamination depends on the microorganism sensitivity to the treatment and, consequently, variable results are commonly reported.

Ultrasound is defined as sound waves with a frequency over 20 kHz, which is about the upper limit of human hearing. Ultrasounds have an antimicrobial effect since they can disrupt biological structures when applied with convenient intensity. This effect can be increased when combined with temperature [5, 6]. Some recent works refer a microbial reduction between 5 and 6 log-cycles for liquid foods treated with power ultrasounds combined with mild thermal treatments [7, 8].

Ultraviolet radiation at 200-280 nm (UV-C) has a germicide action. This technology has been used to control post-harvest contaminations in fruits and vegetables, aiming at extending products' shelf-life. This effect was studied in several fruits, such as peaches [9], strawberries, cherries [10] and pomegranates [11]. In relation to vegetables, UV-C light was applied to zucchini [12] and lettuce [13].

Application of ozone in food industries is an emerging and challenging technology that may improve the value of fresh-like processed foods. Several studies demonstrated that ozone treatments increase shelf life of fruits and vegetables [14], and is often referred as an appropriate method to guarantee food quality and safety [15, 16, 17]. Ozone acts at cell level, oxidizing sulphhydryl groups and amino acids of enzymes, peptides and proteins to shorter peptides. Another proposed mechanism involves oxidation of polyunsaturated fatty acids to peroxides [18].

The objective of this study was to analyse the effect of ultrasonication and its combination with a milder heat treatment (thermosonication), UV-C irradiation and ozone treatments on strawberries, watercress and red bell peppers safety.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Samples

Strawberries (*Fragaria ananassa*), watercress (*Nasturtium officinale*) and red bell pepper (*Capsicum annuum L.*) were acquired in a local market. For strawberries and watercress, safety was assessed in terms of total mesophiles and coliforms, respectively (endogenous flora). In red bell peppers, *Listeria innocua* was enumerated (artificial inoculation). Each red bell pepper sample was artificially inoculated at the surface, with 250 µL of the second *Listeria* subculture (see section 2.1.1. *Listeria innocua* culture). Contact time was 15 minutes. Analyses were carried out in fresh untreated samples and after treatments.

For ultrasonication and ozone treatments, all samples were cut in small portions (approximately 20g). For UV-C treatments, external surface of strawberries were cut and only watercress leaves were used in the experiments.

#### 2.1.1. *Listeria innocua* culture

*Listeria innocua* NCTC 10528 was acquired commercially from Leatherhead Food Research Association (Leatherhead, UK). The first subculture was made in TSB, Tryptic Soy Broth (Lab M, Lancashire, UK), containing 0.6% yeast extract (Lab M, Lancashire, UK) – TSBYE - at 30°C during 24h. The cultures were maintained at 7°C on Tryptic Soy Agar, TSA (Lab M, Lancashire, UK), supplemented with 0.6% yeast extract - TSAYE.

The second subculture of *Listeria innocua* was prepared like the first one at 30°C for ± 24h to yield stationary phase cultures.

## 2.2. Treatments

Ultrasonication (US) and thermosonication treatments were performed in ultrasound equipment (Bandelin Sonorex RK 100H) at 32 kHz. Samples were treated for 2 minutes at 15 °C (ultrasonication) and at 50-65 °C (thermosonication; US 50°C - US 65 °C). Control water washings, at the same temperatures, were also performed.

Ozone treatments were carried out in a pilot plant. An ozone generator (SPO3, model OZ5 from Sociedade Portuguesa de Ozono, Lda.) was interconnected to a container filled with tap water (volume of 30 L), forming a closed circuit ring apparatus. Ozone was continuously incorporated by bubbling in the water, and the ozone content was measured by potential difference (Redox probe; SZ 275 from B and C Electronics). The ozone generator operated at the highest production capacity, resulting in 700 mV of the ozonated water, which corresponded approximately to 0,25 p.p.m. of dissolved O<sub>3</sub>. Samples were immersed in ozonated and non-ozonated (used as control) water baths and removed after 2 minutes.

Ultraviolet radiation experiments were performed for 2 minutes in an UV-C chamber (conceived by University of Algarve, Portugal) with 4 germicide lamps (average intensity of 12.36 Wm<sup>-2</sup>; TUV G30T9, 16 W, Philips). The intensity of flux and dose of exposure (time x intensity) were continuously measured by an UV digital photometer (DO 9721 Delta Ohm).

Four true replicates of all these treatments were performed.

## 2.3. Microbiological analysis

After each treatment, samples were aseptically cut in small pieces and homogenised in a stomacher using 80 mL of Buffered Peptone Water, BPW (Lab M, Lancashire, UK), for 5 minutes. Decimal dilutions were carried out in BPW.

Total mesophiles enumeration was assessed, in duplicate, using Plate Count Agar, PCA (Lab M, Lancashire, UK). Samples were incubated at 30 °C during 3 days, for posterior counts.

Total coliforms enumeration was assessed, in duplicate, using Violet Red Bile Agar, VRBA (Lab M, Lancashire, UK). Samples were incubated at 30°C during 1 day, for posterior counts.

*Listeria* enumeration was assessed, in duplicate, using Palcam Agar containing selective supplement (Merck, Darmstadt, Germany). Samples were incubated at 30 °C during 3 days, for posterior counts.

## 2.4. Data analysis

The treatment effects were assessed by calculation of log-reduction of microbial content, in relation to fresh untreated samples (i.e.  $\log\text{-reduction} = -\log\left(\frac{\text{microbial load of treated samples}}{\text{microbial load of fresh untreated samples}}\right)$ ).

Results were compared by analyses of variance (one-way ANOVA, significance level of 5%), using SPSS<sup>®</sup> 14.0 FOR Windows<sup>®</sup> (2006 SPSS Inc., Chicago, USA). Duncan's test, for means comparison, was also performed.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Total mesophiles in strawberries

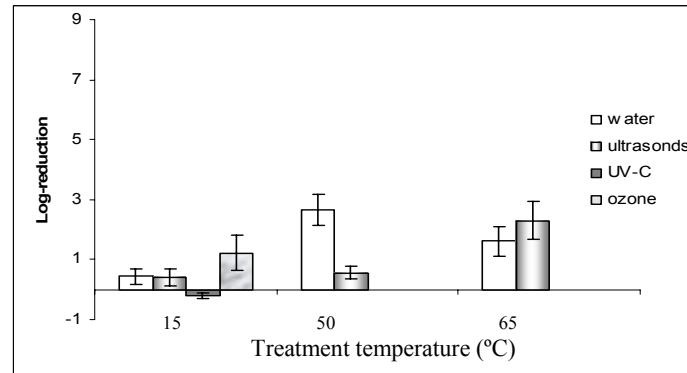
Treatment effects (i.e. water-washings; ultrasonication – US; thermosonication – US 50 °C and US 65 °C; UV-C radiation and ozonation) in total mesophiles reduction of strawberries can be seen in Figure 1.

Ultrasonication at 15 °C (US) and thermosonication at 50 °C were equivalent to a water-washing at 15°C, reducing in average 0.5 log-cycles. Thermosonication at 65 °C reduced approximately 2.5 log-cycles. The treatment was more efficient than a water-washing at the same temperature.

For water-washings at 50 and 65 °C, reductions in total mesophiles counts were higher at the lowest temperature. This can be explained by different thermal resistances of the microorganisms included in mesophiles enumeration.

Ozone treatment provided the highest microbial reductions at 15 °C (~1 log-cycle).

Ultraviolet-C radiation did not inactivate mesophiles in strawberries. Further investigation is required for validation of these results.



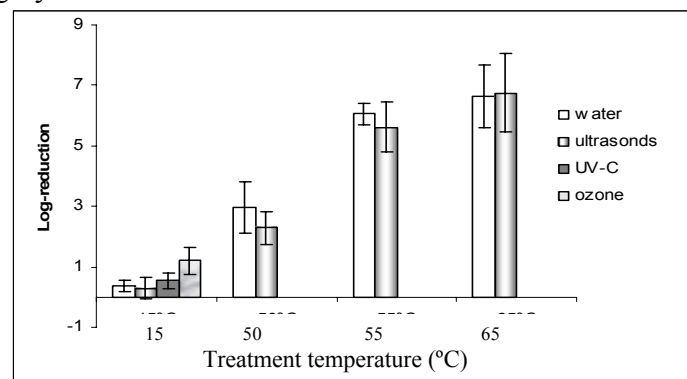
**Figure 1.** Treatment effects (water-washing, ultrasonication, thermosonication, UV-C radiation and ozonation) in total mesophiles reduction of strawberries. *The bars indicate standard deviation of values.*

### 3.2. Total coliforms in watercress

The treatments' impact in total coliforms reduction of watercress can be seen in Figure 2.

Ultrasonication treatments (at 15 °C), UV-C and ozonation were equivalent to a water-washing, reducing in average 1 log-cycle. No significant differences were detected between water-washings and thermosonication at the same temperatures (50, 55 and 65 °C).

The most efficient processes were water-washing and thermosonication at 65 °C, reducing approximately 6 log-cycles.



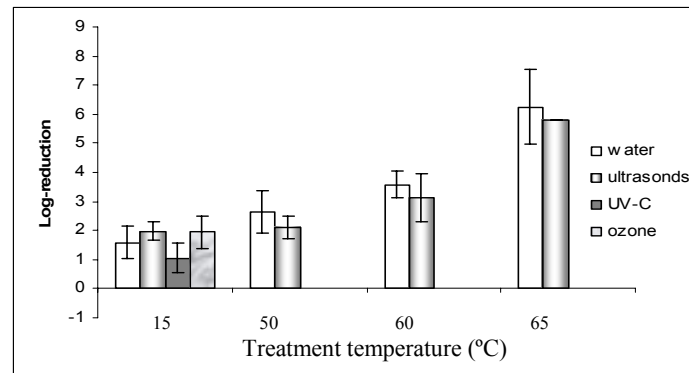
**Figure 2.** Treatment effects (water-washing, ultrasonication, thermosonication, UV-C radiation and ozonation) in total coliforms reduction of watercress. *The bars indicate standard deviation of values.*

### 3.3. *Listeria innocua* in red bell pepper

Results of *Listeria innocua* log-reductions in red bell peppers are presented in Figure 3. No significant differences were detected between the different technologies at the same temperatures. The mean of bacteria log-reductions fell within 1-2 log-cycles, at 15°C.



The most efficient processes were water-washing and thermosonication at 65 °C, reducing approximately 6 log-cycles.



**Figure 3.** Treatment effects (water-washing, ultrasonication, thermosonication, UV-C radiation and ozonation) in *Listeria innocua* reduction of red bell pepper. The bars indicate standard deviation of values.

#### 4. CONCLUSIONS

From the results it is possible to conclude that UV-C radiation was less efficient than water-washings at 15 °C, for all microorganisms/products tested.

Ozone allowed, in average, 1 log-cycle reduction for mesophiles and coliforms, and 2 log-cycles reduction for *Listeria innocua*.

Ultrasonication treatments were equivalent to water-washings at the same temperatures. The temperature has the major effect. For 50 °C, 2 and 3 log-reductions were observed, respectively, for *Listeria innocua*/red bell pepper and coliforms/watercress. For 65 °C, reductions achieved 6 to 7 log-cycles. Mesophiles/strawberries were more heat resistant (2 log-reductions were obtained at 65 °C).

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support through *Programa Operacional Agricultura e Desenvolvimento Rural – Projecto AGRO n°822 (Novas Tecnologias de Processamento de Hortofrutículas Congelados – EMERCON)*. The authors Alexandre E.M.C., Santos D.M. and Brandão T.R.S. would like to thank *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (grants SFRH/BD/16042/2004, SFRH/BPD/9174/2002 and SFRH/BPD/11580/2002, respectively).

#### 6. REFERENCES

- [1] - P. Piyasena, E. Mohareb and R.C. McKellar - *Int. J. Food Microbiol.*, **87** (2003) 207-216
- [2] - G.M. Sapers, R.L. Miller and A.M. Mattrazzo - *J. Food Sci.*, **64** (1999) 734-737
- [3] - D.O. Ukuku, V. Pilizota and G.M. Sapers - *J. Food Safety*, **21** (2001) 31-47

- [4] - A. Allende and F. Artés - *Food Res. Int.*, **36** (2003) 739-746.
- [5] - R.G. Earnshaw, J. Appleyard and R.M. Hurst - *Int. J. Food Microbiol.*, **28** (1995) 197-219
- [6] - J.A. Ordoñez, B. Sanz, P.E. Hernandez and P. Lopez-Lorenzo - *J. Appl. Bacteriol.*, **56** (1984) 175-177
- [7] - A.R. Baumann, S.E. Martin and H. Feng - *J. Food Prot.*, **68** (2005) 2333-2340
- [8] - D.J. D'Amico, T.M. Silk, J.R. Wu and M.R. Guo - *J. Food Prot.*, **69** (2006) 556-563
- [9] - C. Stevens, V.A. Khan, J.Y. Lu, C.L. Wilson, P.L. Pusey and M.K. Kabwe - *Crop Prot.*, **17**(1998) 75-84
- [10] - D. Marquine, C.W. Michiels, A.H. Geeraerd, A. Schenk, C Soontjens, J.F. Van Impe and B.M. Nicolai - *Int. J. Food Microbiol.*, **73** (2002) 187-196
- [11] - V. López-Rubira, A. Conesa, A. Allende and F. Artes - *Postharvest Biol. Technol.*, **37** (2005) 174-185
- [12] - M. Erkan, C.Y. Wang and D.T. Krizek - *Env. Exp. Bot.*, **45** (2001) 1-9
- [13] - A. Allende, J. L. McEvoy, Y. Luo, F. Artés and C. Y. Wang - *Food Microbiol.*, **23** (2006) 241-249
- [14] - R.G. Rice, J.W. Farguhar and L.J. Bollyky - *Ozone Sci. and Eng.*, **4** (1982) 147-163
- [15] - M.A. Khadre, A.E. Yousef and J.G. Kim - *J. Food Science*, **66** (2001) 1242-1252
- [16] - Z.B. Guzel-Seydim, A.K. Greene and A.C. Seydim - *Lebensm.-Wiss. u.-Techno.*, **37**(2004) 453-460
- [17] - G. Manousaridis, A. Nerantzaki, E.K. Paleologos, A. Tsiotsias, I.N. Savvaidis and M.G. Kontominas - *Food Microbiol.*, **22** (2005) 1-9
- [18] - K. Victorin - *Mutation Research*, **277** (1992) 221-238

# EFFECT OF THE THERMAL AND HIGH PRESSURE PRE-TREATMENTS AND OF HIGH PRESSURE SHIFT FREEZING ON GREEN PEPPERS FIRMNESS

Castro,<sup>1\*</sup> S. M.; Van Loey,<sup>2</sup> A.; Saraiva,<sup>1</sup> J.; Smout,<sup>2</sup> C.; Hendrickx,<sup>2</sup> M.

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Aveiro  
Campus Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

Tel +351-234 370 716 Fax +351-284 370 800 e-mail: [scaastro@dq.ua.pt](mailto:scaastro@dq.ua.pt)

<sup>2</sup>Center of Food and Microbial Technology, Katholieke Universiteit Leuven,  
Kasteelpark Arenberg 22, B-3001 Heverlee (Leuven), Belgium

**Keywords:** Pepper, pectin methylesterase, thermal and thermal/high-pressure treatments, texture

**Abstract:** Industrially, bell peppers are usually frozen, after being thermally blanched, to be consumed in salads after thawing. However, texture tend to decrease after this process. Therefore, several thermal (55°C) and thermal/high-pressure (200MPa, 25°C and 55°C) pre-treatments, with and without calcium (0.50%, w/v) addition, were studied for their possible effect on texture improvement of green bell peppers. The temperature-pressure-calcium conditions revealed a significant ( $P < 0.05$ ) enhancement on the firmness of peppers. Peppers pre-treated at the conditions that caused the best firmness improvements were used to further study the effect on firmness of freezing at atmospheric pressure and of high-pressure shift freezing (HPSF). Only the pre-treated samples that were frozen by HPSF (200MPa, -18°C) showed no detrimental effect on firmness ( $P > 0.05$ ), while those frozen at atmospheric pressure (-18°C, -40°C) presented a significant decrease on firmness ( $P < 0.05$ ). The pre-treated samples showed no changes on firmness ( $P > 0.05$ ) after overnight storage, but after 2.5 months storage, only the high pressure pre-treated peppers showed no decrease in firmness ( $P > 0.05$ ), clearly indicating the beneficial effect of the high pressure pre-treatments to retain firmness. These results illustrate the potential of thermal, pressure, combined thermal/high-pressure pre-treatments on firmness improvement of green bell pepper and of HPSF to retain firmness during freezing and frozen storage.

## 1. INTRODUCTION

Nowadays, the consumer demand for natural, fresh-like, more convenient and, at the same time, safe food products, has driven the food industry to apply minimal (mild) efficient techniques to process plant products. Besides, frozen fruits and vegetables, nutritionally similar to fresh ones, are becoming an important part of a healthy, balanced and nutrient rich diet. Unfortunately, the ice crystals formation, an integral part of the freezing process, can damage the fragile membranes causing release of enclosed contents and changes in the microenvironment of food tissues and, as a consequence, affecting the food product texture. This situation points to the need for optimization of conventional technologies as well as their combination with new emerging technologies, such as high-pressure (e.g., combined thermal/high-pressure treatments and high-pressure shift freezing), in order to produce high-quality (including firmness) processed fruit and vegetable products.

The possibility of using milder pre-processes for preservation of tissue integrity and the improvement of quality has been explored in the last years. Pre-heating of some vegetable tissues at temperatures between 50-60°C before canning can reduce canning-induced softening in several plant tissues [1]. It has been suggested that the firming effect obtained

from mild heat treatments alone or even combined with  $\text{CaCl}_2$  treatments [3-5] may be attributed to the action of heat-activated pectin methylesterase (PME, EC 3.1.1.11), a well-known cell-wall bound enzyme, and/or to increased  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion into the tissue. Also, high-pressure (HP) pre-treatments alone or even combined with temperature seem to have a similar positive effect when compared to thermal treatments [6]. Recently, the positive contribution of HP pre-treatments to improve the firmness as well as to preserve food structure during freezing [7,8] has been demonstrated. High-pressure freezing (HPF) promotes uniform and rapid ice nucleation and growth through the whole sample due to the high and uniform degree of supercooling [9], and has been applied with success to several food products. Softening caused by freezing/thawing can sometimes be minimized by pre-treatments of the tissue with  $\text{CaCl}_2$  [10] in combination with mild heat treatments [11,12]. In this work, several high pressure pre-treatments were studied for their possible effect on texture improvement of green bell peppers (*Capsicum annuum*). Considering that freezing is generally preceded by blanching, the effect of several thermal pre-treatments were also investigated, as well as, combined T/HP pre-treatments. For all cases the effect of calcium addition was studied. The pre-treatments showing the best firmness improvement were further studied for the effect of freezing and frozen storage on firmness of peppers.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Thermal and thermal/high-pressure pre-treatments, with/without calcium soaking

Green bell peppers (*Capsicum annuum*) obtained from a local auction (Mechelen, Belgium), were washed, the stems were cut off, and the core removed by hand. Individual samples were prepared by cutting small circles of 20mm diameter, and placed in a double plastic bag and vacuum sealed. The thermal treatments were performed in a pre-set thermostated water bath at 55°C. After each treatment, the samples were immediately cooled in an ice-water bath (5min) and equilibrated at room temperature before texture measurements. The combined thermal/high-pressure treatments (200MPa, at 25°C and 55°C, 15min) were carried out in a single vessel HP equipment (590mL volume, i.d. 50mm, height 300mm), with a maximum operating pressure of 600MPa and a working temperature ranging from -30°C to 100°C (SO. 5-7422-0, Engineered Pressure Systems International EPSInt, Belgium). The pressure medium used was a glycol water mixture (60% Dowcal N, Switzerland). After each treatment, the samples were left at room temperature for 45min, to allow PME catalysed de-esterification of the methylated pectin-substrate, not only during the treatments [13], but also after the pressure release [9,14]. The combination of calcium soaking with thermal and thermal/high-pressure treatments was also evaluated. For calcium soaking, pepper circles were removed from the sealed plastic bags and immersed in a beaker with  $\text{CaCl}_2$ -solution (0.50%, w/v) for 60min at room temperature and 55°C. The samples, treated simultaneously with temperature and calcium, were soaked in a  $\text{CaCl}_2$ -solution, previously equilibrated at 55°C.

### 2.2 Freezing treatments

The effect of the freezing process on texture of peppers was evaluated for non- and pre-treated samples. Pepper samples were frozen by Cryogenic Freezing (CF) and High-Pressure Shift Freezing (HPSF). A programmable cryogenic freezer (Nicool PC Plus, Air. Liquide, Paris, France) was used to freeze the pepper samples. Liquid nitrogen was supplied by a self-pressurized (0.04MPa) vessel (TP60, Air Liquide, Paris, France). The CF conditions were established at pre-set temperatures (-18°C, -40°C). The frozen samples were kept overnight in a conventional freezer at the respective temperature and thawed at room

temperature before texture measurements. The HPSF experiments were performed in the same high-pressure equipment used for combined thermal/high-pressure treatments. The pepper samples at room temperature were placed inside the vessel, with the pressure medium already at -25°C (by external cooling) and the pressure was built up to 200MPa. When the temperature at the centre of the pepper circles reached -18°C, the pressure was released to atmospheric pressure to freeze the pepper samples. Due to the pressure release, the sample temperature increases until the initial freezing point at atmospheric pressure. The samples were kept in the system until they reached -18°C. The frozen samples were transferred to a conventional freezer at -18°C, stored for the appropriate time (overnight or 2.5months), thawed at room temperature and used for texture measurements.

### 2.3 Texture measurements

The texture was measured at room temperature by a texture analyser (TA-XT2i, Stable Micro System), using a holed plate, with the following parameters: 5kg force load cell, 2mm diameter aluminium cylinder probe, and 2.0mm.s<sup>-1</sup> test speed. The property “firmness”, the maximum force (*TP*) applied to puncture the pepper tissue, was measured as an indicator of texture. An average value of firmness from 9 puncture measurements (skin and flesh sides) was calculated for each experimental condition. It should be mentioned that the data shown was for flesh side measurements, even though tests were performed for both sides (skin and flesh). This procedure was adopted, since the measurements performed from the flesh side gave more information (the maximum force registered varied more with the treatments applied) associated to the different conditions under study, probably due to a higher cell heterogeneity and heat sensibility [15].

### 2.4 Data analysis

The firmness decay as a function of heating time (*TP<sub>t</sub>*), at a constant temperature, can be described by a fractional conversion model to explain vegetable tissue texture degradation kinetic data.

$$TP_t = TP_\infty + (TP_0 - TP_\infty) \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (1)$$

The *TP<sub>0</sub>* is the initial firmness and *TP<sub>∞</sub>* is the non-zero equilibrium firmness after prolonged treatment time. For most irreversible first-order reactions *TP<sub>∞</sub>* approaches to zero. Both texture degradation rate constant (*k*) and non-zero equilibrium firmness after prolonged treatment time (*TP<sub>∞</sub>*) were estimated using non-linear regression analysis on equation 1 [16].

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The effect of different temperature-pressure-calcium conditions can be visualized in **Table 1**. The relative firmness was calculated as the ratio between the firmness of the sample after a certain pre-treatment and the firmness of the non pre-treated pepper samples. While immersion in CaCl<sub>2</sub>-solution alone did not improve firmness (*P*>0.05), all the treatments involving heating at 55°C caused an increase (*P*<0.05) in firmness, compared to samples not pre-treated or only immersed in CaCl<sub>2</sub>-solution. For several vegetables it has already been shown that relative firmness increments up to a maximum value, when heated at 50-55°C for 30min [1]. At the same time, PME-activity from different plant sources also reveals a maximum around 50-60°C [17,18]. Previous process stability studies related to pepper PME indicated that after heat treatments at 50-55°C, the relative pepper PME activity of intact tissue and puree samples increased, followed by a fast decay above 60°C [19].

Combined thermal/high-pressure treatments also increased pepper firmness ( $P < 0.05$ ). Comparing the firming effect of thermal and thermal/high-pressure treatments, it can be concluded that pre-treatments at 200MPa, 25°C for 15min ( $134 \pm 11\%$ ) are similar ( $P > 0.05$ ) to a thermal treatment alone at 55°C for 60min ( $132 \pm 4\%$ ), creating the possibility to use high-pressure as an alternative to thermal pre-processing in the improvement of texture of green bell peppers. Other studies have already revealed that firmness could be enhanced by low levels of pressure [14], and that these increments might be related to the effect of HP on the cell structure, which leads to an increase in the extractability of PME from the pepper tissue [19], and further contact of the enzyme with the pectin substrate. At low pressure levels, pepper PME seems to be protected from thermal inactivation [20] and when in presence of pectin substrate, the PME catalyzed reaction exhibited an optimum for enzyme activity [13] at 200MPa, which could be the reason for the improvement of the relative firmness observed. The free carboxyl groups formed during the action of PME could then interact with  $\text{Ca}^{2+}$  ions to form bridges between the pectin chains, resulting in higher firmness and resistance of the tissue to further cooking [1-2].

**Table 1** - Relative firmness (% ,  $\pm$  standard deviation) of pepper samples with different thermal and thermal-high-pressure pre-treatment, with/without calcium soaking.

| Pre-treatment   | Relative firmness (%) |
|---|-----------------------|
| Not pre-treated   | 100.0 $\pm$ 15.3      |
| 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60')                                  | 111.4 $\pm$ 14.2      |
| 55°C (60')  | 132.0 $\pm$ 4.2       |
| 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60') $\rightarrow$ 55°C (60')         | 136.7 $\pm$ 20.6      |
| 55°C + 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60')                           | 118.2 $\pm$ 15.5      |
| 55°C (60') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60')         | 150.4 $\pm$ 13.1      |
| 200MPa, 25°C (15')  | 134.2 $\pm$ 11.0      |
| 200MPa, 55°C (15')  | 107.9 $\pm$ 6.6       |
| 200MPa, 25°C (15') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (45') | 158.7 $\pm$ 11.5      |
| 200MPa, 55°C (15') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (45') | 149.4 $\pm$ 15.5      |

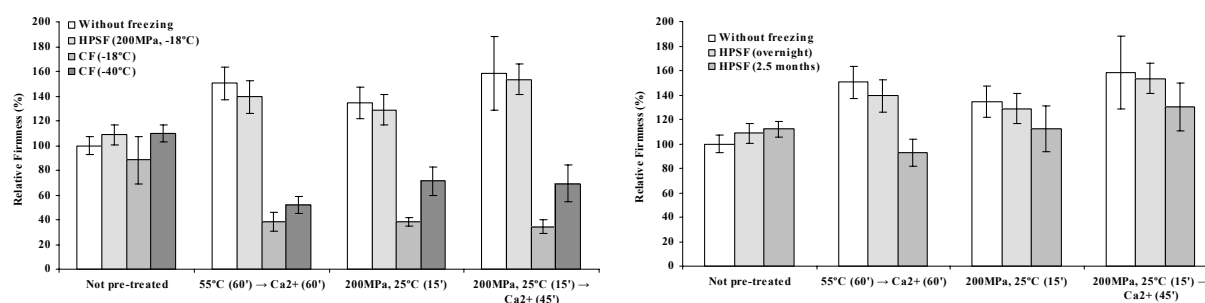
The pre-treatments yielding the best results in terms of firmness were evaluated for their effect on pepper thermal texture degradation kinetics at 90°C, a temperature typically used to blanch peppers prior to freezing. The kinetic parameter estimates for thermal texture degradation at 90°C for pre-treated pepper tissue are presented in **Table 2**.

**Table 2** - Texture degradation rate constant ( $k \pm$  standard error of regression) and relative final texture value ( $TP_{\infty}/TP_0$ ), for thermal (at 90 °C) texture degradation of pre-treated pepper.

| Pre-treatment   | $k \times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | Relative firmness at $t_{\infty}$ ( $TP_{\infty}/TP_0$ , %) |
|---|---------------------------------------|---|
| Not pre-treated   | 7.16 $\pm$ 0.72                       | 10.1 $\pm$ 3.9  |
| 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60')                                  | 4.71 $\pm$ 1.27                       | 23.5 $\pm$ 8.9  |
| 55°C (60')  | 5.37 $\pm$ 0.88                       | 14.9 $\pm$ 6.0  |
| 55°C (60') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (60')         | 3.04 $\pm$ 0.41                       | 17.0 $\pm$ 4.6  |
| 200MPa, 25°C (15')  | 3.90 $\pm$ 0.14                       | 16.0 $\pm$ 1.1  |
| 200MPa, 55°C (15')  | 2.92 $\pm$ 0.18                       | 34.3 $\pm$ 1.6  |
| 200MPa, 25°C (15') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (45') | 1.60 $\pm$ 0.27                       | 17.4 $\pm$ 6.9  |
| 200MPa, 55°C (15') $\rightarrow$ 0.50% $\text{Ca}^{2+}$ (45') | 1.95 $\pm$ 0.16                       | 41.5 $\pm$ 2.2  |

It can be seen that  $k$ -value decreases by 1.3- to 4.5-fold, which means that texture degradation at 90°C of pre-treated pepper is significantly slowed down by all the pre-treatment conditions

investigated: As already observed for other vegetables [6, 21], softness induced by processing at 90°C was clearly slowed down by mild thermal and mild thermal/high pressure pre-treatments. From the different selected conditions, pre-pressurized pepper samples, followed by calcium soaking yield the lowest  $k$ -values. However, higher temperature-pressure conditions (400MPa, 60°C) were necessary to reduce thermal texture degradation of carrots between 90-110°C [6]. Since  $TP_{\infty}$  only becomes important after a very long heating time, unrealistic for industrial applications, the optimisation of texture degradation should be in terms of texture degradation rate constants. Nevertheless, it should be emphasized that for  $TP_{\infty}$ , improvements of 1.5- to 4.1-fold were obtained for all pre-treatments studied. This evidence, together with the observed decrease in the  $k$ -value, clearly illustrates that under the studied conditions, the texture degradation of blanched pre-treated peppers was slowed down. The effect of freezing and frozen storage, on texture of peppers pre-treated by three of the pre-treatments (those showing the most significant beneficial effect on pepper firmness), was further evaluated (**Figure 1**).



**Figure 1** – Effect of freezing (left) and frozen storage (right) on relative firmness (%) of non pre-treated and pre-treated pepper samples. The bars represent the standard deviation of each sample.

Statistical analysis revealed that only the pre-treated samples frozen by HPSF (200MPa, -18°C) showed no detrimental effect on firmness ( $P>0.05$ ), while those frozen by CF (-18°C, -40°C) presented a significant decrease on firmness ( $P<0.05$ ), of about 40-60%, an effect that was more pronounced for CF at -18°C. This may be due to a lower freezing rate at -18°C and, as a consequence large ice crystals causing more detrimental effects on pepper tissue. For the non pre-treated pepper samples no significant differences between the three freezing processes were observed, although these samples showed a lower firmness before the freezing process. Our results seem to be in agreement with other studies where faster freezing improved the texture of frozen carrots [12]. While for overnight storage, all pre-treated samples showed no changes of firmness ( $P>0.05$ ), after 2.5months storage, only the pre-pressurized samples showed no decrease on firmness ( $P>0.05$ ), clearly indicating the beneficial effect of the pressure pre-treatments to retain texture (**Figure 1**).

The results reported in this work, clearly demonstrate the potential of thermal, pressure, and combined thermal/high-pressure pre-treatments, to improve green bell peppers firmness and of high pressure shift freezing to retain firmness during freezing and frozen storage.

### Acknowledgements

S. Castro acknowledges Fundação para a Ciência e Tecnologia for the PhD scholarship (Grant BD/6642/2001), as well as the Fund for Scientific Research Council of Flanders, and the Research Council of the Katholieke Universiteit Leuven for the financial support.

## References

- [1] - A. Wu, H. Chang. Influence of precooking on the firmness and pectic substances of three stem vegetables. *Int J Food Sci Technol* **25** (1990) 558-565
- [2] - E.G. Villarreal-Alba, J.C. Contreras-Esquivel, C.N. Aguilar-Gonzalez, M.L. Reyes-Vega. Pectinesterase activity and the texture of Jalapeño pepper. *Eur Food Res Technol* **218(2)** (2004) 164-166
- [3] - C. Hoogzand, J.J. Doesburg. Effect of blanching on texture and pectin of canned cauliflower. *J Food Technol* **15** (1961) 160-163
- [4] - C.P. Hsu, S.N. Deshpande, N.W. Desrosier. Role of pectin methylesterase in firmness of canned tomatoes. *J Food Sci* **30** (1965) 583-588
- [5] - T. Stolle-Smits, J. Donkers, C. van Dijk, J. Derksen, M.M.A. Sassen. An electron microscopy study on the texture of fresh, blanched and sterilized green bean pods (*Phaseolus vulgaris* L.). *Lebensm-wiss U-Technol* **31** (1998) 237-244
- [6] - D.N. Sila, C. Smout, T.S. Vu, M.E. Hendrickx. Effects of high-pressure pretreatments and calcium soaking on the texture degradation kinetics of carrots during thermal processing. *J Food Sci* **69** (2004) 205-211
- [7] - S. Van Buggenhout, M. Lille, I. Messagie, Van Loey, A., K. Autio, M. Hendrickx. Impact of pretreatment and freezing conditions on the microstructure of frozen carrots: Quantification and relation to texture loss. *Eur Food Res Technol* **222** (2006) 543-553
- [8] - P.P. Fernandez, G. Préstamo, L. Otero, P.D. Sanz. Assessment of cell damage in high-pressure-shift frozen broccoli: comparison with market samples. *Eur Food Res Technol* (2006, in press)
- [9] - Stute R, Eshtiaghi MN, Boguslawski S, Knorr D (1996) High pressure treatments of vegetables. In P.R. Rohrvon, C. Trepp (Eds) *High Pressure Chemical Engineering, Process Technology Proceedings*, 12, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 271-276
- [10] - A. Polesello, G. Crivelli. Addition of calcium salts to fruits as pretreatment for quick freezing. *Ind Agr* **9** (1971) 412-422
- [11] - K. Kaack. Blanching of green bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods Hum Nutr* **46(4)** (1994) 353-360
- [12] - M. Fuchigami, K. Miyazaki, N. Hyakumoto. Frozen carrots texture and pectic components as affected by low-temperature-blanching and quick freezing. *J Food Sci* **60(1)** (1995) 132-136
- [13] - S.M. Castro, A. Van Loey, J.A. Saraiva, C. Smout, M. Hendrickx. Identification of pressure/temperature combinations for optimal pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase activity. *Enz Microb Technol* **38(6)** (2006) 831-838
- [14] - S. Basak, H.S. Ramaswamy. Effect of high hydrostatic pressure processing (HPP) on the texture of selected fruits and vegetables. *J Text Stu* **29** (1998) 587-601
- [15] - E. Cepeda, M.A. Garcia, G. Renobales, E. Costell. Pimento (*Capsicum annuum* L.) purée: preparation, physicochemical properties and microscopical characterisation. *J Food Eng* **45(2)** (2000) 85-92
- [16] - SAS/STAT user's guide (1994) version 6, 4th Ed., SAS institute, Cary, NC, USA
- [17] - A. Aguilera-Carbó, J.C. Montañez, A. Anzaldúa-Morales, M.L. Reyes, J. Contreras-Esquivel, C.N. Aguilar. Improvement of color and limpness of fried potatoes by in situ pectinesterase activation. *Eur Food Res Technol* **210(1)** (1999) 49-52
- [18] - G. González-Martínez, L. Arhné, V. Gekas, I. Sjöholm. Analysis of temperature distribution in potato tissue during blanching and its effect on the absolute residual pectin methylesterase activity. *J Food Eng* **65(3)** (2004) 433-441
- [19] - S.M. Castro, A. Van Loey, J.A. Saraiva, C. Smout, M. Hendrickx. Process stability of *Capsicum annuum* pectin methylesterase in model systems, pepper puree and intact pepper tissue. *Eur Food Res Technol* **221(3-4)** (2005) 452-458
- [20] - S.M. Castro, A. Van Loey, J.A. Saraiva, C. Smout, M. Hendrickx. Inactivation of pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase by combined high-pressure and temperature treatments. *J Food Eng* **75(1)** (2006) 50-58
- [21] - M.C. Quintero-Ramos, M.C. Bourne, A. Anzaldúa-Morales. Texture and rehydration of dehydrated carrots as affected by low temperature blanching. *J Food Sci* **57(5)** (1992) 1127-1139



# AVALIAÇÃO DA DURABILIDADE DE PRODUTOS DE CHOCOLATE. ESTUDO PRELIMINAR APLICADO A BOMBONS

*Pires, R.; Malfeito-Ferreira, M.; Almeida, M.H.G.*

Instituto Superior de Agronomia

Tapada da ajuda, 1349-017 Lisboa

Tel +351-213653566 E-mail: [mhga@isa.utl.pt](mailto:mhga@isa.utl.pt)

**Palavras-chave:** durabilidade, chocolate, bombons, microbiologia, análise sensorial

## **Resumo:**

A durabilidade do chocolate depende de diversos factores, nomeadamente a temperatura e as eventuais oscilações desta bem como a humidade relativa ambiental, responsáveis pela formação de *fat* e *sugar bloom*, respectivamente. Noutros produtos com chocolate, como é o caso dos bombons, para além destes acidentes podem ocorrer interacções entre o recheio e a cobertura de chocolate bem como modificações nas características do recheio. Este tipo de produtos são, além disso, frequentemente alvo da actividade microbiana.

Neste trabalho descrevem-se alguns dos estudos actualmente em desenvolvimento no Instituto Superior de Agronomia sobre a durabilidade de produtos de chocolate.

Bombons confeccionados com dois tipos diferentes de recheio foram sujeitos a diferentes temperaturas de armazenamento, variando entre 16 e 28°C, e avaliados sensorial e fisicamente. Com o objectivo de avaliar os eventuais riscos microbianos, tanto ao nível da saúde pública como tecnológico, determinou-se a evolução de vários indicadores microbiológicos ao longo do tempo e o crescimento de estirpes inoculadas dos géneros *Salmonella*, *Listeria* e *Staphylococcus*.

Os resultados deste estudo fornecerão importantes informações sobre a evolução deste tipo de bombons durante o armazenamento e permitirão apontar valores, cientificamente apoiados, para o período de validade destes produtos.



# ALTERNATIVE METHODS FOR SARDINE OIL RECOVERY

*Fradinho, P. and Batista, I.\**

INRB/IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa. Tel.: 21 302 70 00, Fax: 21 301 59 48, e-mail: [irineu@ipimar.pt](mailto:irineu@ipimar.pt)

**Key words:** sardine by-products, fish oil, acid and alkaline solubilisation

## **Abstract:**

Sardine by-products from the canning industry are rich in oil, which is usually recovered in the fishmeal factories. Fishmeal production involves a cooking process and pressing where the oil is released and further purified by centrifugation. In this work are followed two alternatives to this method for oil recovery from sardine by-products. Both alternatives involved protein solubilisation under acidic and alkaline conditions respectively. Sardine by-products were suspended in water at 1:3, 1:5, and 1:9 ratios and the pH of each slurry adjusted to 2 and 11. After homogenisation, the suspension was centrifuged and the following phases were generally obtained: oil, oil emulsion, aqueous phase, and insoluble fraction. In the case of alkaline solubilisation with the 1:3 ratio the effect of different holding periods (ranging from 0 to 120 min) between the homogenisation and the centrifugation were tested. The oil content of each phase was measured and the free oil as well as the oil present in some fractions was characterized. The highest yield (36.34 %) of oil recovered in alkaline conditions (AO) was obtained in the trial where a 1:3 ratio was used. The holding period did not allow to any increase of the oil release. The yield achieved in the traditional process (TO) was 36.23 %. The peroxide value of AO and TO was 38 and 28 meq O<sub>2</sub>/kg oil, respectively. The chroma value was 1.61 for AO and 2.26 for TO.

## **1. INTRODUCTION**

Sardine by-products are a good source of oil due to the deposition of fat in the viscera, which is typical of small pelagic species. They are the raw material of fishmeal plants where the production of fish oil is so important as fishmeal. The recovery of fish oil represents a significant improvement for the upgrading of this raw material. This importance results from the high price of fish oil in the market due to its applications particularly in the food industry. On the other hand, the recognized health benefits of  $\omega$ 3 fatty acids gave them an additional relevance. The reduction of sardine by-products into fishmeal is the traditional technology for oil separation[1] but several other methods have been developed. These alternative methods include the Conkix Process from Alfa Laval[2], low temperature solvent extraction[3, 4], supercritical fluid extraction[5], enzymatic hydrolysis of proteins[6], fractionation of waste fluids resulting from the manufacturing of highly nutritional fish meat by high-speed centrifugation[7], and acid and alkaline solubilisation of fish meat[8]. Therefore, the objective of this work was to study the oil recovery from canning sardine by-products by acid and alkaline solubilisation and to characterize the oil recovered.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

Sardine by-products (heads, viscera, debris) from the canning industry were used. Sardine oil was extracted following two alternative methods involving acid or alkaline solubilisation of the raw material such as shown in figure 1A. The oil was also extracted by a traditional procedure such as illustrated in figure 1B. Each trial was done at least in triplicate.

Fat content of the several fractions was determined according to the NP1972[9] and the extraction method by Bligh and Dyer[10]. Peroxide value (PV) was measured according to NP904[11] and acid value (AV) following the NP903[12]. Each determination was done in triplicate. The colour of the oil was measured with five replicates, in a colour meter Macbeth Color-Eye 3000. Tristimulus colour coordinates were used to measure redness ( $a^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ) and Chroma ( $((a^{*2}+b^{*2})^{1/2})$ ) value was also calculated.

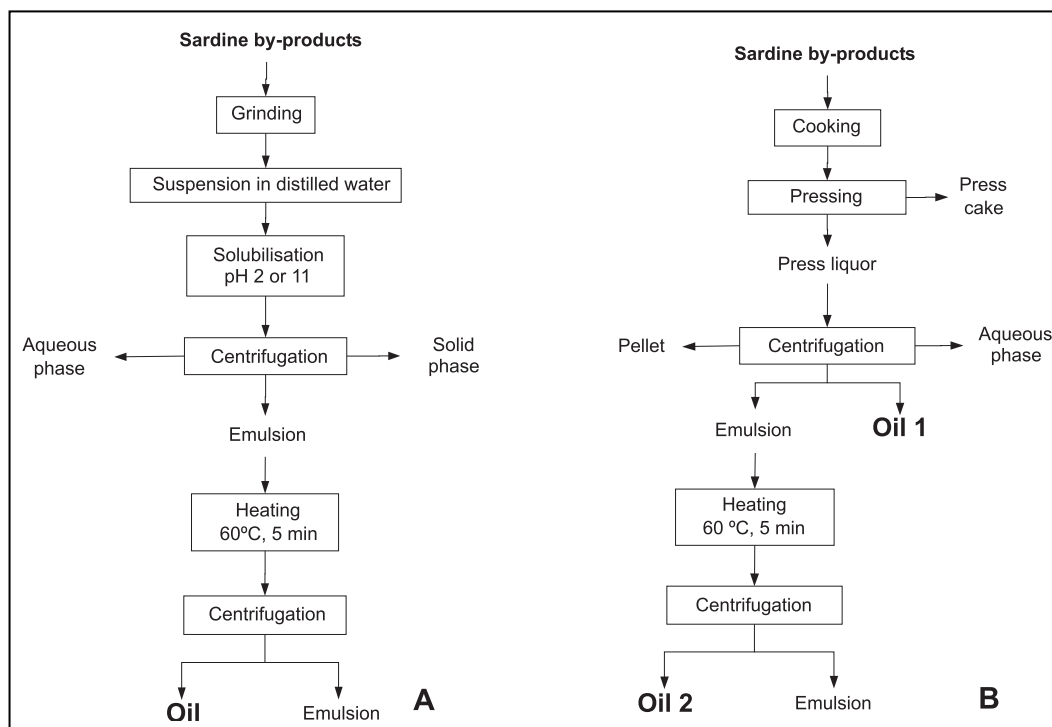


Figure 1 – Oil extraction by acid or alkaline solubilisation (A) and by the traditional method (B).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The raw material used in these trials was very heterogeneous having also a wide variation in fat content from batch to batch. It reflects the pronounced seasonal changes occurring in sardine during its life cycle. In Table 1 are summarized the main results obtained in the oil extraction trials using acid and alkaline solubilisation. The yield of oil released in each alternative procedure was calculated as the percentage of oil released relatively to the total amount of oil in the raw material. It was also calculated the percentage of oil released plus the oil present in the emulsion. The latter oil fraction was extracted from the emulsion using the Bligh and Dyer method[10]. The results obtained suggest an increase of oil released with decreasing fish:water ratio, which is particularly evident in the case of acid solubilisation. The yield achieved was also very low when by-products from lean sardine were used. In lean sardine a large proportion of the fat is in the phospholipids, which are important constituents of cellular membranes and thus more difficult to extracting. However, when considering the oil released and that in the emulsion the highest oil recovery was achieved with the 1:5 ratio. Higher oil recovery was also obtained in the alkaline solubilisation method. The heterogeneity of raw material concerning its fat content is evidenced by the standard deviation. The amount of oil released within trials performed in the same conditions was highly dependent on the emulsion formed. This is evidenced by high coefficients of variation (CV), which were

between 14.5 and 74.9 %. However, considerably lower differences were registered when the total amount of oil was considered (CV changed between 1.4 and 6.4 %).

The yields achieved in the traditional process using sardine by-products with 9.01 % ± 2.02 % fat were 36.23 % ± 7.06 % for the oil released (Oil 1) and 50.27 % ± 11.39 % for the sum of oil 1, oil 2 and the oil in the emulsion. These results were only overcome by the yields obtained in the alkaline process (1:5 ratio) but with fattier raw material.

The holding time did not seem to influence the oil release. These results are not in accordance to those reported by Undeland *et al.*[13] working with herring light muscle. These authors obtained almost 85 % of total lipid removal after 125 min of holding time.

Table 1 – Yields achieved in the extraction of sardine oil by acid and alkaline solubilisation of raw material.

| Fish:water ratio | Acid                           |                                 | Alkaline   |                                   |
|------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|
|                  | Oil released (%)               | Oil released + emulsion oil (%) | Oil released (%)   | Oil released + emulsion oil (%)   |
| 1:3              | --                             | --                              | 36.34 ± 5.41<br>(9.17 ± 0.43)<br>1.95 ± 1.46<br>(3.01 ± 0.14)    | 42.00 ± 2.68<br><br>26.68 ± 13.31 |
| 1:5              | 34.73 ± 9.12<br>(15.85 ± 1.31) | 50.80 ± 9.80                    | 27.46 ± 3.97<br>(13.44 ± 0.60)<br>12.52 ± 2.73<br>(15.85 ± 1.31) | 64.95 ± 2.64<br><br>81.70 ± 11.53 |
| 1:9              | 0.00 ± 0.00<br>(11.61 ± 1.19)  | --                              | 14.34 ± 4.05<br>(11.61 ± 1.19)                                   | 35.67 ± 13.54                     |

In parenthesis is shown the fat content (%) of the different batches used.

The lipid distribution in the various phases resulting from the alkaline solubilisation (1:5 ratio) of sardine by-products with two different fat content is shown in figure 2. It is quite evident the difference of oil released in the trials with sardine by-products from the two seasons. With lean sardine there was no release of oil, but higher percentages were found in the other three phases. The relatively high lipid percentage in the aqueous phase is probably due to lipoproteins complexes remaining in solution or to the presence of emulsion droplets.

The lipid content of press cake was 8.26 ± 1.73 %, which was lower than that of the solid phase obtained in the alkaline processing of raw material with similar fat content.

The peroxide and acid values and colour parameters of oil recovered are showed in Table 2. Oil obtained by acid and alkaline processing was more oxidized than that recovered by the traditional method. This may result from the presence of haemoglobin or its degradation products in the oil or the emulsion formation, which promotes the lipid oxidation. The low PV of oil from the traditional method may also result from the destruction of peroxides during the cooking process. The very low

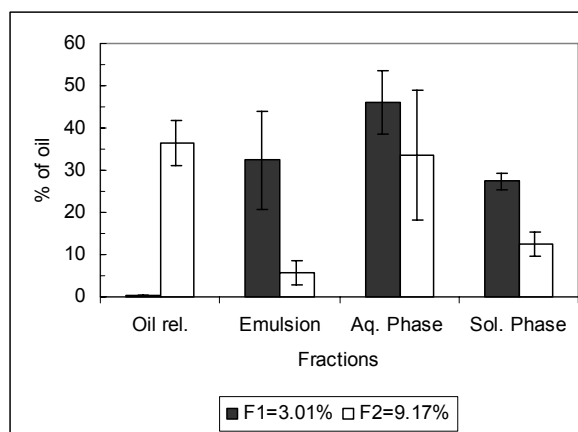


Figure 2 – Oil distribution in the various phases obtained in the alkaline solubilisation of lean sardine (F1=3.01%) and fatty sardine (F2=9.17%).

AV of oil from the alkaline processing indicated that the free fatty acids were extracted to the aqueous phase during processing. The pigment removal (mainly haemoglobin) in the alkaline processing was quite noticeable by the reddish colour of the aqueous phase. However, the elimination of those pigments did not seem to affect the colour parameters of the oil.

Table 2 – Quality parameters of oil recovered by different methods.

| Method      | Fat content of raw material (%) | PV (meqO <sub>2</sub> /kg oil) | AV (%)     | Colour       |              |             |             |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|             |                                 |                                |            | a*           | b*           | Chroma      |             |
| Traditional | 9.01 ± 2.02                     | 28 ± 15.3                      | 5.1 ± 2.1  | -0.15 ± 0.94 | 2.06 ± 1.12  | 2.26 ± 0.93 |             |
| Alkaline    | 1:3                             | 13.44 ± 0.60                   | 38 ± 6.7   | 0.3 ± 0.1    | -0.13 ± 0.37 | 1.56 ± 0.51 | 1.61 ± 0.50 |
|             | 1:5                             | 9.17 ± 0.43                    | 85 ± 7.1   | 0.4 ± 0.1    | -0.28 ± 0.65 | 1.74 ± 0.61 | 1.88 ± 0.38 |
|             |                                 | 15.41 ± 2.31                   | 137 ± 13.0 | 0.3 ± 0.2    | -1.28 ± 0.12 | 3.14 ± 0.42 | 3.40 ± 0.37 |
| 1:9         | 11.61 ± 1.19                    | 118 ± 6.1                      | --         | -0.59 ± 0.36 | 3.97 ± 0.22  | 3.21 ± 1.61 |             |
| Acid        |                                 |                                |            |              |              |             |             |
| 1:5         | 15.85 ± 1.31                    | 115 ± 25.6                     | 2.5 ± 0.3  | -1.13 ± 0.10 | 1.04 ± 0.10  | 1.54 ± 0.01 |             |

### Acknowledgements

This work was done in the frame of the project QCA III “Biotecnologia dos Organismos Marinheiros”. The authors would like to express their gratitude to Produtos Alimentares António & Henrique Serrano, S.A. (SARDINAL) for the supply of sardine by-products.

### References

- [1] – J. Brody – *Fishery By-Products Technology*, The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut (1965).
- [2] – I. Aidos - Production of High-Quality Fish Oil from Herring Byproducts. Ph.D. Thesis. Wageningen University, The Netherlands (2002).
- [3] – M. L. Windsor – Torry Advisory Note no. 39, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station (1977).
- [4] – T. Suzuki – *Fish and krill protein: Processing Technology*, Applied Science Publishers Ltd, London (1981).
- [5] – M. M. Esquível, N. M. Bandarra, I. Fontan, M. G. Bernardo-Gil, I. Batista, M. L. Nunes, J. A. Empis - *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **30** (1997) 715.
- [6] – G. A. Gbogouri, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier – *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108** (2006) 766.
- [7] – F. Hirata, H. Saeki, M. Nonaka, K. Kawasaki, T. Oozumi, K. Motoe – *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59** (1993) 111.
- [8] – J. W. Park (ed.) – *Surimi and Surimi Seafood*, Marcel Dekker, Inc., New York (2000).
- [9] – NP1972 – Pescado. Determinação do teor de matéria gorda livre – (1992)
- [10] – E. G. Bligh, W. J. Dyer – *Can. J. Biochemical and Physiology.* **37** (1959) 91.
- [11] – NP904 - Gorduras e óleos comestíveis. Determinação do índice de peróxido (1987).
- [12] – NP903 – Gorduras e óleos comestíveis. Determinação do índice de acidez e da acidez. Método titrimétrico (1987).
- [13] - I. Undeland, S. D. Kelleher, H. O. Hultin - *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 7371.

# AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO COMBINADOS COM A SONICAÇÃO EM CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA

*Alegria, C.<sup>1\*</sup>; Gonçalves, E.M.<sup>1</sup>; Pinheiro, J.<sup>1</sup>; Fernandes, I.<sup>1</sup>; Moldão-Martins, M.<sup>2</sup>; Abreu, M.<sup>1</sup>*

1. Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI, Estrada Paço do Lumiar, 22, 1649-038  
Lisboa, Portugal.

2. Centro de Estudos Agro-Alimentares, ISA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

\*Telf.: +351 21 7127100; Fax: +351 21 7127162; e-mail: carla.alegria@mail2.ineti.pt;

**Palavras-Chave:** Descontaminação; Ultrassons; Tratamentos combinados; Cenoura minimamente processada.

**Resumo:** A descontaminação efectiva de hortofrutícolas para consumo em fresco é uma operação crítica devido à multiplicidade da flora contaminante e aos diferentes mecanismos de adesão dos microrganismos à superfície irregular dos vegetais. No caso particular dos hortofrutícolas minimamente processados, o corte representa uma dificuldade acrescida devido à disseminação dos microrganismos por uma maior área superficial e à disponibilização de substratos que, promovendo a formação de biofilmes, confere aos microrganismos uma protecção adicional. A ultrassonicação, pelo efeito mecânico gerado pela cavitação, poderá contribuir para a melhoria dos resultados da operação de descontaminação já que facilita a libertação dos microrganismos dos locais de difícil acesso e promove o aumento da permeabilidade das células microbianas facilitando a acção letal do agente descontaminante. O objectivo deste estudo foi avaliar a eficácia de descontaminação alcançada pelas combinações da sonicação (45 kHz) com hipoclorito de sódio (50 ppm, US x HIPO) e com calor (50°C, US x TT), a fim de aumentar a estabilidade microbiológica em cenoura minimamente processada (ripada). A aplicação dos tratamentos foi efectuada em cenoura inteira (prévio à operação de corte) com duração constante e igual a 1 min, para todas as combinações testadas. A eficácia da descontaminação foi avaliada através da redução na carga microbiana (contagem de microrganismos a 30°C) inicial do produto após o processamento mínimo. Os níveis de redução obtidos foram de 0.5 Log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> para US x HIPO e de 1.3 log<sub>10</sub> UFC.g<sup>-1</sup> para US x TT, nunca excedendo o dos tratamentos isolados. Dado que estes níveis de redução são inferiores aos aconselhados na descontaminação de hortofrutícolas (cerca de 3-4 Log<sub>10</sub>), a metodologia utilizada revelou-se, relativamente ao produto em estudo, inadequada.

## 1. Introdução:

Hortofrutícolas minimamente processados, também designados como “produtos de IV Gama” na nomenclatura francesa, são produtos refrigerados, prontos a consumir em fresco, cortados, descontaminados e embalados, apresentando-se os tecidos vegetais metabolicamente activos durante o período de vida útil [1].

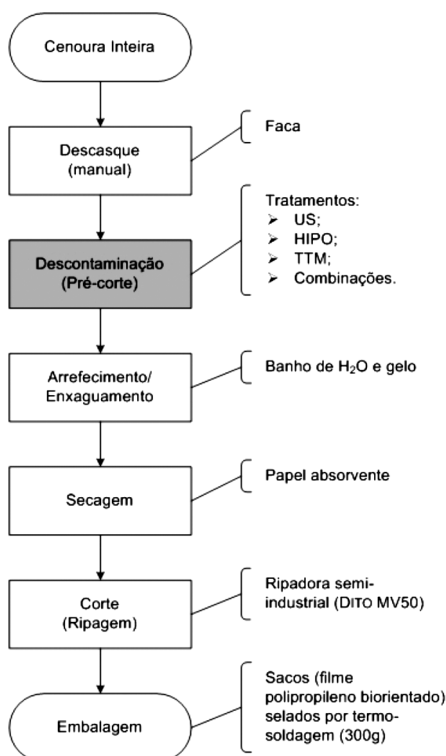
O processamento mínimo compreende essencialmente um conjunto de operações unitárias de preparação e redução de dimensões (selecção/calibração, lavagem e corte), constituindo as operações de descontaminação (efectuada habitualmente por imersão em água clorada) e de embalagem as poucas intervenções tecnológicas que concorrem para a conservação do produto. No caso particular da cenoura minimamente processada (CMP), o desenvolvimento microbiano acelerado [2] é, em grande medida, responsável pelo respectivo curto período de vida útil. A redução da carga microbiana inicial através da cloragem revela-se na maioria dos

casos ineficaz para atingir os objectivos de descontaminação (*c.a.*  $10^4$  a  $10^5$  ciclos Log) aconselhada pela FDA [3]. A multiplicidade da flora contaminante e o desenvolvimento de mecanismos de adesão dos microrganismos à superfície irregular dos vegetais, representam os principais entraves para a redução microbiana. As combinações de ultrasons com os métodos químicos (hipoclorito de sódio) ou físicos (calor), têm sido objecto de estudo na procura de sinergias de descontaminação em hortofrutícolas minimamente processados [4, 5]. Para o efeito são normalmente efectuados tratamentos de sonicação, utilizando frequências de 20 a 40 kHz, em meio aquoso. Nesta gama de frequências, as ondas de cavitação (com formação de “microbolhas”) geradas, promovem a remoção / libertação dos microrganismos dos locais de difícil acesso, facilitando a acção letal dos agentes descontaminantes utilizados na combinação [4]. O efeito sinérgico da combinação de ultrasons com a utilização de hipoclorito de sódio foi demonstrado num estudo efectuado em alface cortada [5].

Foi objectivo deste trabalho avaliar o efeito da sonicação combinada com calor e com hipoclorito de sódio em cenoura inteira (prévio ao corte em ripas), na redução da carga microbiana inicial e na qualidade físico-química e sensorial de CMP.

## 2. Material e métodos

Foi utilizada cenoura *cv.* Nantes (lote 20 kg), para a constituição das amostras de referência (cenoura ripada, não descontaminada, embalada) e minimamente processadas (diagrama da Figura 1), submetidas aos tratamentos singulares de sonicação, frequência de 45 kHz durante 1 min [US], hipoclorito de sódio na concentração de 50 ppm cloro livre durante 1 min [HIPO], tratamento térmico a 50°C / 1 min [TT] e combinações de sonicação com hipoclorito de sódio [US x HIPO] e de sonicação com calor [US x TT], segundo as mesmas condições. Todos os tratamentos foram realizados num banho de sonicação com capacidade de 45 l (Elma Transsonic TI-H-55, termostatzado  $\pm 2^\circ\text{C}$ ) com controlo de temperatura.



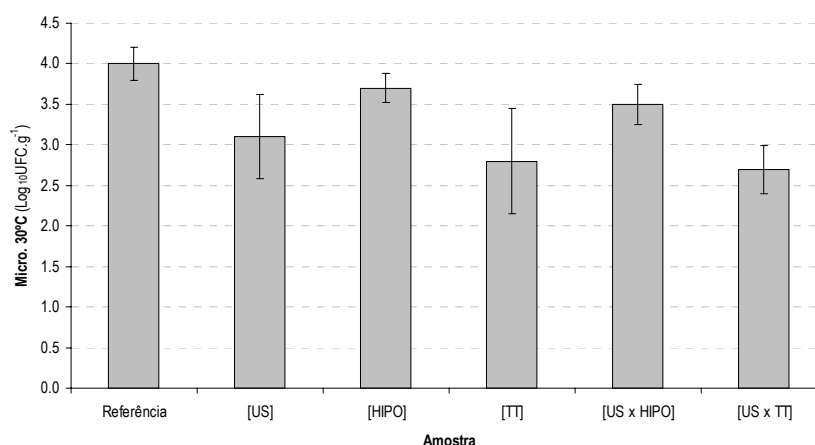
**Figura 1** Diagrama de preparação das amostras de CMP.



Triplicados das amostras de referência e tratadas minimamente processadas, foram submetidas, antes e após processamento, ao seguinte protocolo analítico de avaliação: microrganismos a 30°C [6], TSS (refractômetro ATAGO DRA1), acidez [7], pH (potenciômetro Crison Micro pH 2001), cor (CIELab; cálculo do parâmetro  $h^{\circ}$ ) e avaliação sensorial dos atributos cor, grau de frescura, aroma, firmeza e da apreciação global das amostras (painel semi-treinado de 8 provadores). O tratamento estatístico de resultados (ANOVA, teste Tukey,  $p=0.05$ ) foi realizado com recurso ao software STATISTICA v6.1.

### 3. Resultados e discussão

As contagens médias para os Micro. 30°C das diferentes amostras, encontram-se expressas na figura 2.



**Figura 2.** Contagens médias de Micro. 30°C das amostras de referência e minimamente processadas. As barras verticais representam o desvio padrão.

As amostras [US], [HIPO] e [TT], apresentaram contagens de Micro. 30°C inferiores à amostra de referência (carga inicial de 4.0 ciclos Log), em 0.9, 0.3 e 1.2 ciclos Log, respectivamente. Os resultados de todos os tratamentos singulares, conduziram a reduções microbiológicas pouco expressivas e insuficientes por si só. Relativamente à combinação [US x HIPO], verificou-se que a redução alcançada foi de 0.5 ciclos Log, valor intermédio relativamente aos resultados que se obtiveram com os tratamentos singulares. Também na combinação [US x TT], as reduções obtidas (de 1.3 ciclos Log) apresentaram diferenças não significativas ( $p>0.05$ ) relativamente aos respectivos tratamentos singulares. Estes resultados permitem concluir a ausência de efeitos aditivos ou sinérgicos de descontaminação, em sequência de todas as combinações testadas.

Os resultados da avaliação dos atributos físico-químicos e sensoriais são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

**Tabela 3.** Valores médios e desvios padrão dos atributos físico-químicos das amostras de referência e minimamente processadas.

| Amostras          | pH               |     | TSS<br>(°Brix)    |     | Cor<br>(tonalidade h°) |     |
|-------------------|------------------|-----|-------------------|-----|------------------------|-----|
|                   | Média            | DP  | Média             | DP  | Média                  | DP  |
| <i>referência</i> | 6.7 <sup>b</sup> | 0.1 | 10.0 <sup>c</sup> | 0.3 | 69.0 <sup>ab</sup>     | 1.2 |
| [US]              | 6.5 <sup>a</sup> | 0.0 | 9.7 <sup>bc</sup> | 0.1 | 68.6 <sup>a</sup>      | 1.1 |
| [HIPO]            | 6.5 <sup>a</sup> | 0.1 | 9.1 <sup>a</sup>  | 0.2 | 69.7 <sup>bc</sup>     | 1.3 |
| [TT]              | 6.5 <sup>a</sup> | 0.0 | 8.8 <sup>a</sup>  | 0.3 | 69.7 <sup>bc</sup>     | 1.1 |
| [US x TT]         | 6.5 <sup>a</sup> | 0.1 | 9.6 <sup>a</sup>  | 0.2 | 68.7 <sup>a</sup>      | 1.0 |
| [US x HIPO]       | 6.5 <sup>a</sup> | 0.0 | 9.0 <sup>a</sup>  | 0.3 | 69.7 <sup>bc</sup>     | 1.4 |

Nota: Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0.95.

**Tabela 4.** Valores médios e desvios padrão dos atributos sensoriais das amostras de referência e minimamente processadas.

| Amostras          | Cor              |     | Grau de frescura |     | Aroma             |     | Firmeza          |     | Apreciação Global |     |
|-------------------|------------------|-----|------------------|-----|-------------------|-----|------------------|-----|-------------------|-----|
|                   | Média            | DP  | Média            | DP  | Média             | DP  | Média            | DP  | Média             | DP  |
| <i>referência</i> | 3 <sup>a</sup>   |     | 1 <sup>a</sup>   |     | 1 <sup>a</sup>    |     | 1 <sup>a</sup>   |     | 3 <sup>b</sup>    |     |
| [US]              | 3.0 <sup>a</sup> | 0.0 | 1 <sup>a</sup>   | 0.0 | 1.1 <sup>ab</sup> | 0.3 | 1.0 <sup>a</sup> | 0.0 | 1.6 <sup>a</sup>  | 0.3 |
| [HIPO]            | 3.5 <sup>b</sup> | 0.0 | 1 <sup>a</sup>   | 0.0 | 4.4 <sup>d</sup>  | 0.5 | 1.3 <sup>a</sup> | 0.3 | 2.3 <sup>ab</sup> | 0.5 |
| [TT]              | 3.0 <sup>a</sup> | 0.0 | 1 <sup>a</sup>   | 0.0 | 3.5 <sup>c</sup>  | 0.4 | 1.3 <sup>a</sup> | 0.3 | 2.4 <sup>ab</sup> | 0.5 |
| [US x TT]         | 2.8 <sup>a</sup> | 0.3 | 1 <sup>a</sup>   | 0.0 | 1.9 <sup>b</sup>  | 0.3 | 1.0 <sup>a</sup> | 0.0 | 1.8 <sup>a</sup>  | 0.6 |
| [US x HIPO]       | 2.8 <sup>a</sup> | 0.3 | 1 <sup>a</sup>   | 0.0 | 3.5 <sup>c</sup>  | 0.4 | 1.3 <sup>a</sup> | 0.3 | 2.6 <sup>ab</sup> | 0.5 |

Nota: Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0.95. Os valores apresentados pela amostra de referência correspondem aos limites de aceitabilidade para cada atributo considerado.

Os resultados expressos na tabela 3, mostram que as variações de pH registadas entre amostras, sem significado estatístico ( $p > 0.05$ ), nunca excederam 0.2 unidades. O teor de sólidos solúveis sofreu uma ligeira diminuição, não significativa, após tratamentos ( $p > 0.05$ ), cuja diferença máxima de 1% revela a presença de fenómenos de lixiviação pouco expressivos. A comparação entre a tonalidade (h°) apresentada pela amostra referência e as restantes amostras também não traduz variações significativas, reflectindo a preservação da cor inicial após todos os tratamentos.

De acordo com os resultados da apreciação sensorial (Tabela 4), verifica-se que a percepção do aroma em fresco foi o único atributo a ser penalizado, com significado estatístico ( $p < 0.05$ ) no pós-tratamentos (afastamento à condição em fresco fixado pela amostra de referência na âncora 1), obtendo as amostras [HIPO], [TT] e [US x HIPO] as classificações médias mais elevadas. Independentemente da depreciação do aroma, todas as amostras obtiveram uma boa aceitação (classificações  $< 3$ ), verificando-se a aproximação máxima ao limite de aceitabilidade (âncora 3) nas amostras [US x HIPO].

#### 4. Conclusão

Apesar da constatada preservação das condições em fresco, de extrema importância neste tipo de produtos, a eliminação de microrganismos contaminantes através das combinações da sonicação com hipoclorito de sódio e com calor (nunca excedendo o limite de 1.5 ciclos Log), revela a inadequação das mesmas, nas condições testadas, para efeitos de descontaminação de CMP (ripada).

## Referências

- [1] A.E. Watada, Q. Ling. *Quality of fresh-cut produce*. Postharvest Biology and Technology. **15**(3) (1999) 201.
- [2] R.D. Hagenmaier, R.A. Baker. *Microbial population of shredded carrot in modified atmosphere packaging as related to irradiation treatment*. Journal of Food Science, **63**(1) (1998) 162.
- [3] J.P. Cherry. *Improving the safety of fresh produce with antimicrobials*. Food Technology, **53**(11) (1999) 54.
- [4] P. Piyasena, C. Dussault, T. Koutchma, H.S. Ramaswamy, G.B. Awuah. *Radio frequency heating of foods: Principles, applications and related properties - A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **43** (2003) 587.
- [5] I.J. Seymour, D. Burfoot, R.L. Smith, L.A. Cox, A. Lockwood. *Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables*. International Journal of Food Science and Technology, **37** (2002) 547.
- [6] Norma EN ISO 4833: 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C*.
- [7] NP 1421: 1977. *Gêneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez*.

## AVALIAÇÃO VITAMÍNICA E ANÁLISE DE ACEITAÇÃO DE PRODUTOS FEITOS A BASE DE BANANA VERDE

Borges<sup>1</sup>, M.T.M.R.; Bolini<sup>2</sup>, H.M.A.; Prado<sup>2</sup>, M.A.; \*Godoy<sup>2</sup>, H.T.

<sup>1</sup> UFSCAR – Dep. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, Araras-SP. <sup>2</sup> UNICAMP - Dep. Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP. \*[helena@fea.unicamp.br](mailto:helena@fea.unicamp.br)

O alto índice de desperdício de bananas no Brasil (30 a 50 %) conduziu a busca de alternativas de processamento simples e familiar que utilizem bananas verdes para aproveitar as pencas que se perdem antes de estarem prontas para o amadurecimento, garantindo assim a competitividade para pequenos e médios agricultores. O objetivo do presente trabalho foi a produção de nhoque e pão utilizando banana verde além da avaliação vitamínica e a análise sensorial de aceitação destes produtos. Utilizou-se de banana da variedade Nanicao, cujos frutos foram cozidos com casca em panela de pressão por 10 minutos. Após serem descascados foram homogeneizados e essa massa foi utilizada na produção do nhoque e do pão em substituição à farinha de trigo. Foram adquiridos e analisados produtos similares como pão de trigo integral e nhoque de batata. A caracterização das vitaminas do complexo B e o  $\beta$ -caroteno foram realizadas utilizando-se da técnica CLAE e a determinação das formas da vitamina C, ácido L-ascórbico e ácido L-desidroascórbico foram determinadas através de método titulométrico. A análise de aceitação foi realizada com 30 provadores que se manifestaram em fichas sensoriais com escala hedônica não estruturada, sendo também avaliada a atitude de compra dos produtos tanto os feitos a base de popa de banana verde como os convencionais de mercado. Os teores vitamínicos obtidos para os produtos foram: *nhoque de banana*, B<sub>6</sub> - 0,9 mg/100g, B<sub>1</sub> - 0,8 mg/100g,  $\beta$ -caroteno - 0,2 mg/100g; *nhoque de batata*, B<sub>6</sub> - 1,0 mg/100g, B<sub>1</sub> - 1,1 mg/100g,  $\beta$ -caroteno - 0,1 mg/100g; *pão de banana*, B<sub>6</sub> - 1,1 mg/100g, B<sub>1</sub> - 1,1 mg/100g,  $\beta$ -caroteno - 0,8 mg/100g, LAA - 6,0 mg/100g; *pão de trigo integral*, B<sub>6</sub> - 0,8 mg/100g, B<sub>1</sub> - 0,7 mg/100g,  $\beta$ -caroteno - 0,1 mg/100g. O resultado da análise sensorial revelou que pão elaborado com banana verde obteve médias inferiores às do pão integral convencional, no entanto, sempre acima da metade da escala, valor este relacionado ao conceito de indiferença, não gostei mas também não desgostei. Para o nhoque de banana os atributos sabor e textura não apresentaram diferença significativa do nhoque de batata, o que torna o resultado bastante promissor indicando um produto passível de ser melhorado quanto aos itens aparência e aroma.

# AVALIAÇÃO DA QUALIDADE TECNOLÓGICA DE VARIEDADES DE TRIGO MOLE E DE TRIGO DURO

*Parreira, A.; Penacho, J.; Patanita, M.; Ferro Palma, J.; Dores, J.(\*) e Natividade, M.*

Escola Superior Agrária de Beja, Centro de Experimentação Agrícola  
Rua de Pedro Soares, 7801-903 Beja  
Tel +351-284 314 300 Fax +351-284 388 207 e-mail: [jdores@esab.ipbeja.pt](mailto:jdores@esab.ipbeja.pt)

**Palavras-chave:** trigo mole, trigo duro, variedades, qualidade tecnológica

**Resumo:** Nos anos agrícolas de 2004/2005 e 2005/2006 foram realizados, pelo Centro de Experimentação Agrícola da Escola Superior Agrária de Beja, ensaios de campo para avaliar o potencial produtivo e a qualidade tecnológica de sete variedades comerciais de trigo mole e de trigo duro. Os parâmetros de qualidade analisados foram, para as variedades de trigo mole, a massa do hectolitro, o Índice de queda, o Índice de Zeleny, o teor de glúten, o rendimento em farinha e os resultados do alveograma (P, L, P/L e W) e, para as variedades de trigo duro, a massa do hectolitro, o Índice de queda e a vitreosidade. O ano agrícola de 2004/2005 foi muito seco, o que se reflectiu muito negativamente na produção, mas que levou à obtenção de farinhas de boa e muito boa qualidade para a indústria da panificação de quase todas as variedades de trigo mole ensaiadas. O ano agrícola de 2005/2006 foi bom tanto para a produção de semente como para a qualidade das farinhas produzidas, embora a qualidade tenha sido ligeiramente inferior à do ano anterior. Neste ano a maior parte das variedades de trigo mole ensaiadas foi classificada como de boa qualidade para panificação. No conjunto dos dois anos e dos dois locais em que os ensaios foram realizados, as variedades de trigo mole que apresentaram uma maior qualidade para panificação foram a Gazul, a Bolonga e a Sagitário. As variedades de trigo duro, pelo contrário, não deram indicações satisfatórias. Para as variedades de trigo duro os valores da vitreosidade foram quase sempre muito baixos, não atingindo os valores estabelecidos pelos Regulamentos Comunitários para a sua qualidade-tipo.

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da qualidade tecnológica dos trigos, para a indústria da panificação no caso dos trigos moles e para a indústria das massas alimentares no caso dos trigos duros, é de grande utilidade, tanto para os agricultores, que escolhendo as variedades de maior qualidade tecnológica podem obter melhores condições para a comercialização da sua produção, como para a indústria, que assim pode actuar de forma a obter produtos alimentares com a qualidade desejada. A qualidade tecnológica dos trigos depende em grande medida da escolha da variedade e das condições ambientais de cada local e de cada ano.

Entre os vários dos trabalhos de investigação e experimentação de apoio à comunidade agrícola realizados anualmente pelo Centro de Experimentação Agrícola da Escola Superior Agrária de Beja estão os ensaios de variedades de trigo mole e de trigo duro, com os quais se pretende avaliar o rendimento em semente e a qualidade tecnológica de algumas das variedades comerciais de trigo mole e de trigo duro. Neste trabalho são apresentados os resultados da experimentação realizada nos últimos dois anos agrícolas (2004/2005 e 2005/2006).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Em cada um dos anos os ensaios foram realizados em dois locais distintos (Montes Velhos e Penedo Gordo no primeiro ano e Montes Velhos e Beja no segundo ano). Em ambos os anos foram colocadas em ensaio sete variedades de trigo mole (Artur Nick, Babui, Bolonga, Gazul, Kumberri, Sagitário e Trocadero) e três variedades de trigo duro (Arcobaleno, Carioca e Colosseo).

Os ensaios de campo foram realizados segundo um dispositivo experimental em blocos casualizados completos com quatro repetições. Da totalidade da semente colhida em cada parcela experimental foi retirada uma amostra. As quatro amostras, correspondentes a cada uma das quatro repetições realizadas para cada variedade, foram misturadas e homogeneizadas, obtendo-se assim uma amostra composta por variedade. Em seguida, utilizando um divisor-homogeneizador de sementes mecânico, tipo divisor de terras, fez-se a redução da amostra composta até à obtenção da amostra de laboratório, com a qual foram realizadas as análises de qualidade tecnológica.

Os parâmetros de qualidade analisados e as normas seguidas foram, para as variedades de trigo mole, a massa do hectolitro (NP - 988:1993), o Índice de queda (NP - 1590:1986), o Índice de Zeleny (NP - 1871:1998), o teor de glúten seco (NP - 2244:1984), o rendimento em farinha e os resultados do alveograma (P, L, P/L e W) (NP - 3181:1986) e, para as variedades de trigo duro, a massa do hectolitro (NP - 988:1993), o Índice de queda (NP - 1590:1986) e a vitreosidade (NP - 1870:1991).

Do ponto de vista climático os dois anos foram bastante distintos: o ano agrícola de 2004/2005 foi dominado pela seca que se fez sentir durante quase todo o ano agrícola, a que se associaram, durante a formação das sementes, temperaturas elevadas; o ano agrícola de 2005/2006, pelo contrário, ficou caracterizado pela regular distribuição da precipitação durante quase todo o desenvolvimento dos trigos; apenas nas fases de formação e maturação das sementes predominaram condições de alguma *secura* e temperaturas elevadas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os trigos moles o ano agrícola de 2004/2005 foi, de uma forma geral, um mau ano para a produção, mas um bom ano para a qualidade. Em relação aos resultados do alveograma é de notar que a força panificadora (W) dos trigos moles, na média dos dois locais, deu resultados que permitiram classificar a variedade Gazul como um trigo melhorador ou de força ( $W \geq 350$ ), embora o valor da relação P/L tenha excedido o valor recomendado (entre 0,7 e 0,9). Todas as outras variedades, com excepção da Trocadero, que foi a de mais fraca qualidade ( $W \leq 120$ ), deram resultados que as permitiram classificar como trigos panificáveis com qualidade superior ou com qualidade corrente [1]. Os valores do glúten, de uma forma geral bastante elevados, indicam que as massas obtidas das farinhas produzidas apresentavam uma boa elasticidade e extensibilidade, permitindo que durante o processo fermentativo elas aumentem de volume. O Índice de Zeleny, como atingiu um valor médio superior a 38 em todas as variedades, indica que estamos perante trigos melhoradores ou de força [2]. Por fim, os valores do Índice de Queda ou de Hagberg foram, de uma forma geral, ligeiramente superiores ou próximos de 300, valor indicador de uma baixa actividade amilásica, o que dá origem a massas mais secas e com menor volume [2]. Os baixos valores deste índice significam também, como seria de esperar, a ausência de sementes germinadas nas espigas após a maturação. Quer o Índice de Zeleny quer o Índice de Queda ultrapassaram os valores mínimos exigidos pelos regulamentos comunitários para a qualidade-tipo dos trigos moles [3].

A força panificadora (W), o glúten e o Índice de Zeleny apresentam, normalmente, uma correlação positiva com o teor de proteína nas sementes [2]. Assim sendo, os elevados valores destes parâmetros indiciam um elevado teor de proteína nas sementes. Sabendo-se que condições de stresse hídrico, como as que prevaleceram em 2004/2005, conduzem normalmente a uma diminuição da qualidade tecnológica das farinhas de trigo, a explicação para a boa qualidade das farinhas observada neste ano tem de ser procurada noutros factores. Por um lado a reduzida produção de semente significou uma repartição do azoto disponível por um menor número de sementes. Por outro, a escassa precipitação registada ao longo do ano permitiu, devido à menor lixiviação dos nitratos, a conservação do azoto aplicado no solo, mantendo-se este disponível para absorção pelas plantas. A conjugação destes dois factores pode justificar a boa qualidade para panificação das farinhas produzidas neste ano e os teores por certo elevados de proteína nas sementes.

No ano agrícola de 2005/2006, beneficiando de condições ambientais favoráveis, os rendimentos em semente foram elevados mas, pelo contrário, a qualidade tecnológica dos trigos moles não foi tão boa como no ano anterior, em especial no ensaio situado em Beja. No ensaio de Montes Velhos, em solos de textura mais ligeira, os resultados foram, em média, ligeiramente melhores em 2005/2006. Analisando os resultados de uma forma global constata-se que a força panificadora (W), o glúten e o Índice de Zeleny deram resultados inferiores aos do ano anterior. De qualquer forma, mesmo em baixa, os resultados mostram que, com excepção da variedade Artur Nick, a farinha de todas as variedades ensaiadas apresentou qualidade para panificação. Os valores da força panificadora (W) das variedades Bolonga, Gazul e Sagitário permitiram classificá-las como panificáveis de qualidade superior ( $W \geq 220$ ) [1]. Na maioria das variedades o Índice de Zeleny situou-se num intervalo (entre 28 e 38) que permite qualificar os trigos como de boa qualidade para panificação [2]. O tempo seco que predominou desde a maturação até à colheita permitiu que os valores de Índice de Queda se mantivessem elevados, indiciando uma baixa actividade amilásica [2]. Numa apreciação geral pode-se dizer que de 2004/2005 para 2005/2006 a qualidade para panificação dos trigos moles baixou de muito boa para boa.

Foram observadas diferenças importantes na qualidade para panificação entre as variedades de trigo mole ensaiadas (Quadro 1). No conjunto dos dois anos a variedade com maior força panificadora (W) foi a Gazul ( $W=322$ ). Contudo, esta variedade apresentou também um valor de P/L superior à unidade ( $P/L=1,16$ ), fora do intervalo recomendado (entre 0,7 e 0,9) [1], indicativo de que a farinha dá origem a massas demasiado tenazes. As variedades Sagitário ( $W=256$ ) e Bolonga ( $W=247$ ) apresentaram também uma elevada força panificadora, sendo que esta última apresentou ainda um valor da relação P/L bastante favorável ( $P/L=0,91$ ). Todas estas variedades podem ser classificadas como panificáveis de qualidade superior [1].

**Quadro 1** - Valores da qualidade tecnológica das sete variedades de trigo mole na média dos dois anos e dos quatro locais de ensaio

| Variedade  | P (mm) | L (mm) | P/L  | W ( $\times 10^{-4}J$ ) | Rendimento Farinha (%) | Glúten (%) | Índice Zeleny (mm) | Índice Queda (s) | Massa Volúmica (kg/hl) |
|------------|--------|--------|------|-------------------------|------------------------|------------|--------------------|------------------|------------------------|
| Babui      | 80     | 70     | 1,51 | 200                     | 51,4                   | 6,7        | 38                 | 360              | 79,2                   |
| Kumberri   | 57     | 66     | 0,89 | 141                     | 54,0                   | 6,7        | 37                 | 376              | 67,5                   |
| Bolonga    | 60     | 83     | 0,91 | 247                     | 55,2                   | 9,6        | 45                 | 339              | 74,0                   |
| Gazul      | 97     | 85     | 1,16 | 322                     | 47,5                   | 9,4        | 43                 | 366              | 78,4                   |
| Trocadero  | 63     | 78     | 0,90 | 136                     | 50,9                   | 8,3        | 41                 | 360              | 67,0                   |
| Sagitário  | 93     | 87     | 1,28 | 256                     | 55,8                   | 10,7       | 45                 | 377              | 74,8                   |
| Artur Nick | 39     | 87     | 0,44 | 109                     | 54,2                   | 6,7        | 30                 | 334              | 75,5                   |

Relativamente aos trigos duros (Quadro 2) é de realçar que em ambos os anos e locais e para todas as variedades os valores da vitreosidade foram, com uma única excepção, inferiores a 80%, valor mínimo referência para a qualidade-tipo de trigo duro, tal como está definida nos regulamentos comunitários [4]. No primeiro ano foi a variedade Arcobaleno a que apresentou, na média dos dois locais, o valor mais elevado (68%); no segundo ano a melhor variedade foi a Colosseo (73%). Em relação ao Índice de Queda em todos os casos o seu valor excedeu os 300, ultrapassando o valor de referência para a qualidade-tipo (250) [4].

**Quadro 2** - Valores da qualidade tecnológica das três variedades de trigo duro na média dos dois anos e dos quatro locais de ensaio

| Variedade  | Vitreosidade (%) | Índice Queda (s) | Massa Volúmica (kg/hl) |
|------------|------------------|------------------|------------------------|
| Arcobaleno | 63               | 389              | 76,7                   |
| Carioca    | 46               | 397              | 78,4                   |
| Colosseo   | 66               | 393              | 78,3                   |

#### 4. CONCLUSÕES

Tanto a variedade, como o ano e o local dos ensaios, exerceram uma nítida influência sobre a qualidade tecnológica dos trigos. Comparativamente entre si, as variedades mostraram um comportamento bastante constante de um ano para o outro e entre locais. Entre anos e entre locais as diferenças foram mais marcadas. Se a quantidade total de precipitação e a sua distribuição ao longo do desenvolvimento da cultura são factores de grande importância, também o são as condições edáficas prevalentes em cada local de ensaio. No primeiro ano os melhores resultados da qualidade para panificação foram registados no ensaio do Penedo Gordo, em solos calcários de textura pesada; no segundo ano os resultados da qualidade tecnológica dos trigos moles em Montes Velhos, sobre solos calcários, mas de textura mais ligeira, foram ligeiramente melhores dos que os observados em Beja, em solos classificados como “Barros Pretos não calcários” de textura bastante pesada. Em relação à qualidade dos trigos duros o local não exerceu uma influência significativa.

#### Referências

- [1] - Brites, C.M. - A qualidade na fileira trigo, farinha e produto transformado. Investigação agrária. Dezembro 2000. (2000)
- [2] - Lopez Bellido, L. - Cultivos Herbáceos. Vol I - Cereales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (1991).
- [3] - Jornal Oficial das Comunidades Europeias - Regulamento (CEE) N° 2054/93 do Conselho de 19 de Julho de 1993 (1993).
- [4] - Jornal Oficial das Comunidades Europeias - Regulamento (CEE) N° 2731/75 do Conselho de 29 de Outubro de 1975 (1975).



# BEHAVIOUR OF VOLATILE COMPOSITION DURING THE HEATING PROCESS OF TNM RED WINES

*Perestrelo, R.; Caldeira, M.; Rodrigues, F.; Oliveira, L.; Marques, J.C.; Câmara, J.S. \**  
Centro de Química da Madeira, Departamento de Química da Universidade da Madeira, Campus  
Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal. Portugal.  
Tel: +351 291705112 Fax: +351 291705149 e-mail: [jsc@uma.pt](mailto:jsc@uma.pt)

**Keywords:** wine; heating process; furanic compounds; acetals; lactones

**Abstract:** In this work, sweet (TM-S) and dry (TM-D) red wines from Tinta Negra Mole (TNM) grapes, produced by two different vinification process, were heated at different temperatures (30, 45 and 55°C) during 1 and 4 months. Wine samples preparation includes a dichloromethane liquid-liquid extraction followed by concentration under a stream of pure nitrogen to 500  $\mu\text{l}$ . Extracts were analysed using a Varian gas chromatograph equipped with an Varian Saturn 3 mass selective detector and Saturn GC/MS workstation software. The identification and quantification of main volatiles and respective chemical families, ranging from few  $\mu\text{g L}^{-1}$  to more than 100  $\text{mg L}^{-1}$ , are represented. However, since this work cover only two model wines, the present data do not (presumably) reflect the variability of the wine composition of commercial wines.

The most important changes detected during the “estufagem” (heating/backing process) were the increase of the furanic compounds, acetals and lactones and the decrease the decrease of the acetates contents. Formation of furfural and 5-hydroxy(methyl)-2-furfural is clearly favoured at 55°C in sweet TNM wines, showing the impact of temperature and sugar level in the process.

## 1. INTRODUCTION

Among the many factors that contributed to the typicity and quality of wine, aroma is probably the most important organoleptic characteristic and a key attribute for consumers. Several hundred chemically different flavour compounds such as: *higher alcohols, aldehydes, ethyl esters of fatty acids, fatty acids, ketones, monoterpenes, volatile phenols*, among others, have been found in wines. They have quite different chemical and physical properties like polarity and volatility and their concentrations range from few  $\text{ng L}^{-1}$  to more than 100  $\text{mg L}^{-1}$ . The impact of each of the substances in the final aroma is different, according to its concentration, physical-chemistry characteristics and threshold perception (LPO) [1].

Over the last few decades wine aroma has been thoroughly studied, resulting in knowledge of about 800 compounds as constituents of the volatile fraction of the wine. Some components are present in high concentration (hundreds of  $\text{mg L}^{-1}$ ), but most of them are found at the low  $\text{ng L}^{-1}$  level [2]. Therefore some components need to be extracted and concentrated before analysis, while others can be analysed by GC with direct injection. Although it is a time-consuming technique liquid-liquid extraction is a widely used sample preparation method for the determination of wine volatiles which extract contains a wide spectrum of components. Among the solvents that have been used for the enrichment of aroma substances, dichloromethane has been found to be well suited for extracting volatiles from a matrix with high alcohol content such as TNM wines.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Sample extraction conditions

To 50 ml of each sample wines were added 25  $\mu\text{L}$  of internal standard (octan-3-ol), in hydro alcoholic solution (1/1, v/v) at 422  $\text{mg L}^{-1}$  and 5 g of sodium sulphate was added to the samples which was extracted twice with 5 ml of dichloromethane. Both organic phases obtained were blended and dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated in a roto-evaporator to a final volume of 2-3 mL and, finally, under a stream of pure  $\text{N}_2$  to 500  $\mu\text{L}$ . The extract was injected (1  $\mu\text{L}$ ) into the GC-MS. Identification was achieved by comparisons with mass spectra obtained from the sample with those from the pure standards injected in the same conditions by comparing the Kováts index and the mass spectra presents in the NIST MS library Database, or in the literature.

The quantification was carried out following the internal standard quantification method. Thus, octan-3-ol was chosen as internal standard [25  $\mu\text{L}$  of a 0.422  $\text{mg L}^{-1}$  solution in ethanol (1:1, v/v) of this internal standard was added to each standard and sample]. Quantitative data of the identified compounds were obtained by interpolation of the relative areas versus the internal standard area, in the calibration graphs built for pure reference compounds.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The validated analytical procedure [3] allowed the identification and quantification of more than twenty volatile compounds, present in the volatile fraction of different types of TNM red wines in study: 4 lactones, 3 isomers of dioxanes and dioxolanes and 9 furanic compounds.

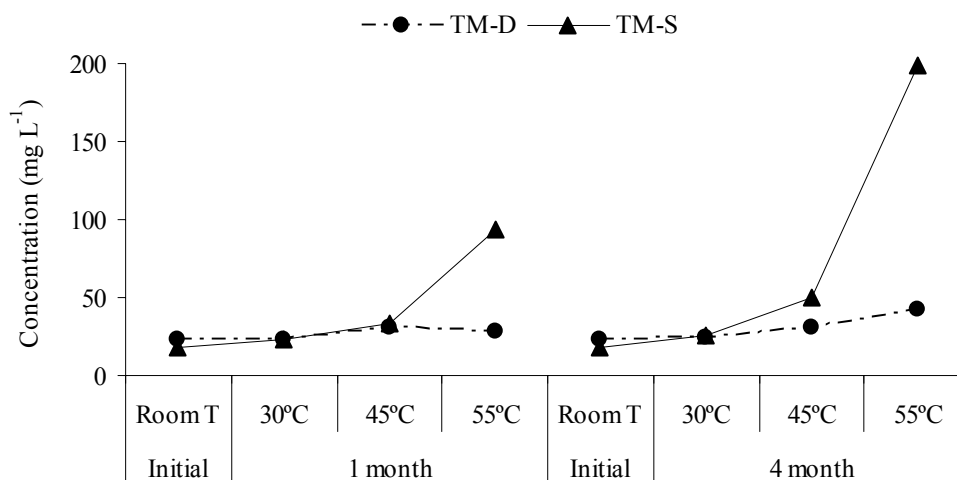


Fig. 1. Evolutions of total free fraction of dry (TM-D) and sweet (TM-S) TNM red wines, during estufagem process, (a) time of estufagem and (b) different temperatures.

Fig. 1. presents, under as histogram, the total aromatic free fraction of the identified and quantified chemical families determined in the wine under study. The furanic compounds increase significantly at 55°C (up to 181.57  $\text{mg L}^{-1}$  and 14.71  $\text{mg L}^{-1}$ , for TM-S and TM-D, respectively). Initially, TM-D and TM-S present a total aromatic free fraction of 23.57  $\text{mg L}^{-1}$  and 18.18  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively. The increase verified in the first month of heating at different temperatures (30, 45 and 55°C) was: 4.78  $\text{mg L}^{-1}$  and -0.41  $\text{mg L}^{-1}$  (slight decrease); 6.59  $\text{mg L}^{-1}$  and 15.37  $\text{mg L}^{-1}$  and finally 4.25  $\text{mg L}^{-1}$  and 75.99  $\text{mg L}^{-1}$ , for TM-D and TM-S, respectively. The total increase during the 4 month of heating (30, 45 and 55°C) was: 0.48  $\text{mg L}^{-1}$  and 7.56  $\text{mg L}^{-1}$ ; 7.73  $\text{mg L}^{-1}$  and 31.49  $\text{mg L}^{-1}$  and finally 18.75  $\text{mg L}^{-1}$  and 180.98  $\text{mg L}^{-1}$  for TM-D and TM-S, respectively.

### **3.1. Evolution of the:**

#### **3.1.1. Lactones**

$\gamma$ -octalactone and  $\gamma$ -nonalactone are the major compounds of this chemical family. However, the 1<sup>st</sup> is more abundant and show the highest evolution during heating. The maximum change in TM-D wines was detected for temperatures above 45 °C where the total amount decreases from 0.66 mg L<sup>-1</sup> to 0.54 mg L<sup>-1</sup> at the end of the heating stage. In TM-S wine the total amount of lactones slightly increases during the heating process (up to 0.20 mg L<sup>-1</sup>) but 2,3-di-hydroxy-6-methyl-2H-piron-4-one (DDMP) was also identified in these wines. Their origin is associated with the Amadori rearrangement, resulting from the reaction between and amino compounds, followed by a cyclisation and dehydration, which leads to the DDMP formation, in accordance with Maillard reaction [4].

#### **3.1.2. Acetates**

In the wines under study, the only identified acetate was 2-phenylethyl acetate. This compound decreases, in general, during the heating process. Initial values of 4.95 mg L<sup>-1</sup> and 3.54 mg L<sup>-1</sup> obtained for TM-D and TM-S show a maximum to 3.16 mg L<sup>-1</sup> and 2.76 mg L<sup>-1</sup> at the end of the heating process. The evolution of this chemical family is determined by the balance of the esterification reaction between acid and alcohol. During the heating process, the kinetics of these reactions tends to decrease.

#### **3.1.3. Acetals**

The Madeira is a fortified wine and the high alcoholic content contributes for the acetalisation reaction between aldehydes and alcohols or polyols, such as, glycerol. The acetals contents, in these types of wines are, in general, higher than in non-oxidized wines [4].

*Cis*- and *trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane (*cis*-dioxane), and the *cis*-4-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxolane (*cis*-dioxolane), result from acetalisation between acetaldehyde and glycerol. In the 1<sup>st</sup> month, a maximum increase of 0.36 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) and 0.29 mg L<sup>-1</sup> (TM-S) was detected. The maximum amount during the entire process was: 1.25 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) and 0.72 mg L<sup>-1</sup> (TM-S). This chemical family is favoured at 55°C for TM-D and at 45°C for TM-S wines. The increase for the 1<sup>st</sup> month of “estufagem” at 45°C is 0.28 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) and 0.27 mg L<sup>-1</sup> (TM-S) and 0.62 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) mg L<sup>-1</sup> and 0.70 mg L<sup>-1</sup> (TM-S) for the entire heating process. At 55°C the increase is 0.37 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) and 0.18 mg L<sup>-1</sup> (TM-S) and 1.17 mg L<sup>-1</sup> (TM-D) and 0.31 mg L<sup>-1</sup> (TM-S) for the 1<sup>st</sup> month and the heating period, respectively.

#### **3.1.4. Furanic compounds**

Compounds include in this chemical family are formed by thermal degradation of cellulose and hemicellulose (during the preparation of wood casks) and from the heating degradation of carbohydrates [5]. The last mechanisms can explain the high concentrations determined for sweet wines. The sugar level determined for the wines under study was 3 and 92 g dm<sup>-3</sup> for TM-D and TM-S, respectively.

2-Furfural (F), ethyl 2-furoate and 5-hydroxy(methyl)-2-furfural (HMF) were the major compounds identified in the wines under study. However ethyl 2-furoate was only identified in the TM-S. No significant changes were observed at 30°C. A small change was verified at 45 °C at the end of heating. At 55°C HMF and F increases significantly up 0.18 mg L<sup>-1</sup> and 14.46 mg L<sup>-1</sup> and 43.06 mg L<sup>-1</sup> and 27.52 mg L<sup>-1</sup> for TM-D and TM-S, respectively. In addition, TM-S wines show at the end of heating (55 °C) a total amount of 110.80 mg L<sup>-1</sup> of

ethyl furoate. The compound is not detected in TM-D. This temperature can possibly favour the kinetic if Maillard reaction of the degradation of sugars.

#### 4. CONCLUSION

During “estufagem” it is verified that the evolution of levels of the chemical families studied depends of the conservation time and temperature. The only acetate identified was 2-phenylethyl acetate, and its levels tend to decrease during the heating process. Furanic compounds (2-furfural, ethyl 2-furoate and 5-hydroxymethyl-2-furfural, etc) were observed that during “estufagem” occurs an increase of its levels, more being accented at 55°C. In this way, can be affirmed that possibly this temperature favours the kinetic one degradation of the sugars. Of the identified lactones, it is observed that  $\gamma$ -octalactone it presents a diverse behaviour in the analyzed samples, it decreases for TM-D and increases for TM-S, during of heating. The acetals levels increase during “estufagem”, for TM-S wines the formation of this chemical family are favoured to the 45°C, however, in TM-D wines it is at 55°C. The volatile phenols and the sulphur compounds during of heating do not present a very significant evolution.

#### REFERENCES

- [1] R Castro.; R. Natera; P. Benitez; C. G. Barroso - *Anal. Chimica Acta.* **513** (2002) 141
- [2] Y. Kotseridis; R. Baumes - *J. Agric. Food Chem.* **48** (2002) 400
- [3] R. Perestrelo; A. Fernandes, F.F. Albuquerque; J. C. Marques, J.S. Câmara – *Anal Chimica Acta* **563** (2006) 154
- [4] J. S. Câmara, Doctoral Thesis, *Caracterização Aromática de Castas Produtoras de Vinho Madeira. Boal, Malvazia, Sercial e Verdelho*, Universidade da Madeira, 2004
- [5] T. G. Cerdán, D. T. Goñi, C. A. Azpilicueta, *J. of Food Engineering* **65** (2004) 349

#### Acknowledgment

This study was supported by INTERREG III-B MAC (Feder) (project ANTIVINMAC 05/MAC/2.3/M28).

## **BRACKETING *VERSUS* MULTI-POINT CALIBRATION: DEVELOPING ANALYTICAL PERFORMANCE FOR PLASTIC FOOD CONTACT MATERIALS**

*<sup>a</sup>André, C.; <sup>a</sup>Marques, S.; <sup>a</sup>Castanheira, I.; <sup>ab</sup>Sanches-Silva, A.T.; <sup>b</sup>Paseiro, P.  
<sup>a</sup>Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Lisbon – Portugal  
<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Pharmacy,  
University of Santiago de Compostela, Campus Sur, Santiago de Compostela, Spain*

The European Union (EU) has established a Frame Directive on materials and articles intended to come into contact with food (N° 1935/2004) that includes a list of 17 groups of materials and articles which may be covered by specific measures. Plastics are regulated by Commission Directive 2002/72/EC which contains a list of all substances that can be used for their manufacturing. This positive list includes all monomers, other starting substances and additives that can be used to manufacture plastics, as well as restrictions to migration levels of those chemicals into foodstuffs. There are two important restrictions, the overall migration limit, which is 60 mg of constituents release per kilogram of foodstuff, and specific migration limits (SML) which depend on the characteristics of the substances. The use of substances not included in the list is forbidden and some of the substances included in the list do not have SML.

Many of the restricted compounds are lipophilic and their analysis in conventional fatty food simulants, like olive oil, presents technical difficulties and consequently, results between laboratories are difficult to compare. One way of overcoming these difficulties would be to improve performance of analytical methods. The choice of the method depends on priori information about the experimental design, on the resources available and on the objectives of the measurement. One of the priori considerations to be taken into account is the linearity of the detector/analyser. In this work two different methods are used to quantify the components of food simulants.

The first method involved bracketing the concentration of unknown sample between adjacent concentrations of two standards. It assumes that a linear algebraic interpolation of the analyser response can be made between the concentrations of these two standards. The difference in the concentrations of the two bracketing standards was small enough that the uncertainty in a linear response was small compared with the uncertainty of the overall quantification process.

In the second method, to allow for the non-linearity of the analyser, its response was measured over the required range of concentrations by generating a four or five point calibration curve with appropriate known concentration standards. The multi-position method fit a model to the analyser response over the whole range.

When olive oil was used as a food simulant good agreement was obtained with bracketing. The preliminary results to determine the concentration of monomers indicated that multipoint calibration seems more appropriate.

## EDIBLE COATINGS FROM GALACTOMANNANS AND THEIR APPLICATION TO TROPICAL FRUITS

Cerqueira, M.A.<sup>1</sup>, Lima, A.M.P.<sup>2</sup>, Monteiro-Moreira, A.C.O.<sup>3</sup>, Moreira, H.H.T.<sup>3</sup>, Vicente, A.A.<sup>1</sup>,  
Teixeira, J.A.<sup>1</sup>, Moreira, R.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Minho, Braga, Pt.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, CE, Br.

<sup>3</sup>UNIFOR, CE, Br.

email:avicente@deb.uminho.pt

Edible coatings play an important role in the quality and in the resistance to transportation, storage and display of a wide range of fresh and processed foods. Polysaccharide coatings with an oil-free appearance and low caloric content can be used to increase the shelf life of fresh fruits, since they allow the modification of the internal gas composition of fruits, retarding their senescence. The objective of this work was to study the ability of seed galactomannans, with different manose:galactose relation, from the *Leguminosae Caesalpineae pulcherrima* (2.8:1) and *Adenantha pavonina* (2:1) as coatings to extend the shelf life of acerola (*Malpighia emarginata*), cajá (*Spondias lutea*), mango (*Mangifera indica*), pitanga (*Eugenia uniflora*) and sirigüela (*Spondias purpurea*). Fresh fruits surface properties, galactomannans relative viscosity as well as the wetting capacity of the coatings were determined. Galactomannans were obtained from seed endosperm and their toxicological safety was determined by oral administration to Wistar adult rats. No toxic effects were detected. Blends with different galactomannan:glycerol proportions were tested as coatings. The blends wettability was determined by the spreading coefficient using the sessile-drop method. The best proportions of galactomannan/glycerol were determined for coatings of *C.pulcherrima* and *A.pavonina* in the various fruits tested.

Supported by: FCT, Alfa-Valnatura, CNPq, CAPES, FUNCAP.

**Key words:** galactomannan, edible films, edible coatings, fruits.

# CARACTERIZAÇÃO AROMÁTICA POR GC-MS E ANÁLISE SENSORIAL DE TRÊS VINHOS BRANCOS DO DOURO, DAS CASTAS *CERCIAL, RABIGATO E SÍRIA*

*Cortinhas<sup>1</sup>, L.; Falco<sup>1a</sup>, V.; Abade<sup>2</sup>, E.; Barros<sup>3</sup>, A.; Barros<sup>1b\*</sup>, A.*

<sup>1</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

<sup>1a</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Indústrias Alimentares, 5001-911 Vila Real, Portugal; Tel +351- 259 350 558 Fax +351-259 350 480 e-mail: [vfalco@utad.pt](mailto:vfalco@utad.pt)

<sup>1b</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Química, 5001-911 Vila Real, Portugal; Tel +351- 259 350 283 Fax +351-259 350 480 e-mail: [abarros@utad.pt](mailto:abarros@utad.pt)

<sup>2</sup> Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro, Régua

<sup>3</sup> Universidade de Aveiro, Departamento de Química, 3810-193, Aveiro, Portugal; Tel +351-234 372 581 Fax +351-234 370 084 e-mail: [antbarros@dq.ua.pt](mailto:antbarros@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** vinho, GC-MS, aroma, PCA, casta

**Resumo:** Este trabalho foi efectuado com o objectivo de comparar e caracterizar o comportamento enológico das castas Síria, Rabigato e Cercial em semelhantes condições de vinificação. Assim, realizou-se uma análise organoléptica e uma análise por GC-MS, de forma a serem correlacionados os perfis aromáticos obtidos. Foi ainda efectuada uma análise em componentes principais com o objectivo de caracterizar os vinhos em função dos compostos detectados por SPME-GC/MS. Os resultados obtidos a partir dos perfis de compostos voláteis, indicam um melhor perfil aromático para os vinhos obtidos a partir da casta Síria e mistura das diferentes castas, podendo ser a mistura destas três castas uma solução para o melhoramento do perfil aromático.

## 1. INTRODUÇÃO

Numa fase inicial, procedeu-se ao acompanhamento da maturação de cada casta de forma a ser marcada a vindima na altura mais correcta. Durante o período de maturação das uvas, foram recolhidas periodicamente amostras de modo a serem acompanhados os seus constituintes a nível de açúcares, pH, acidez total e grau alcoólico provável. Na segunda parte do trabalho, procedeu-se à vinificação das 3 castas que tinham sido vindimadas previamente, obtendo-se daí 4 vinhos, um de cada casta e um outro da mistura equitativa das três. Por fim, foram feitas todas as análises físico-químicas e a prova organoléptica. Compararam-se diversos parâmetros que qualificam a qualidade de um vinho. Foi ainda feita a análise dos álcoois superiores, ésteres e compostos terpénicos usando a técnica de GC-MS. Neste trabalho serão apresentados todos os resultados obtidos, bem como uma análise em componentes principais (PCA) com o objectivo de caracterizar os vinhos em função dos compostos detectados por GC-MS. Por outro lado, será demonstrado a potencialidade da utilização dos dados físico-químicos para estimar as proporções de castas em vinhos resultantes de misturas de castas. Finalmente, será apresentada uma comparação entre os aromas identificados para cada casta pelo painel de provadores, e os obtidos através do GC-MS.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A prova dos 4 vinhos foi efectuada na mesma data. Foi realizada pelo serviço de prova do Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro. O painel foi constituído por 6 provadores, com o objectivo, não só de obter uma avaliação geral dos quatro vinhos, mas também de tentar identificar o maior número odores. A análise organoléptica foi feita seguindo duas fichas de prova; na primeira ficha foram analisados os parâmetros: cor, aroma e sabor e foi ainda atribuída uma nota global a cada vinho, numa escala de zero a vinte. Numa segunda ficha de prova, o painel identificou aromas ou odores. Os provadores não tiveram acesso prévio ao nome das castas. As notas finais foram atribuídas a partir do cálculo da mediana das notas finais atribuídas por cada provador a cada vinho.

Foi feita a análise dos álcoois superiores, ésteres e compostos terpênicos usando a técnica de GC-MS. De forma a extrair as maiores fontes de variabilidade no que diz respeito ao perfil de componentes voláteis determinados por GC-MS, foi realizada uma análise em componentes principais.

A análise em componentes principais dos perfis de aromas das 3 monocastas e da mistura das três castas permitiu extrair dois componentes principais que descrevem a quase totalidade da variabilidade presente nos dados originais.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Aromas ou odores identificados pelo painel de provas

Uma vez efectuadas as provas organoléticas, representou-se a frequência de citação dos descritores fornecidos pelo painel. Na casta Síria (figura 1) o painel destacou como aromas que caracterizam o vinho o floral, o aroma a limão e frutos tropicais.

Em relação à casta Rabigato, a avaliação sensorial por parte do painel de provadores (figura 2) mostra que nesta casta o descritor floral se destaca de todos os outros. A casta Cercial apresenta como principal descritor flor de laranjeira seguida de outros descritores também presentes em grandes quantidades, como: floral, chás, ananás, bananas, citrinos, frutos tropicais e tília.

A mistura das três castas teve como principal descritor identificado pelo painel de provadores o aroma a citrinos; o painel forneceu esta avaliação com bastante coerência.

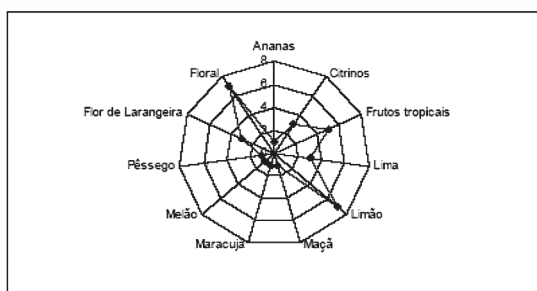


Figura 1 – Aromas identificados na Síria

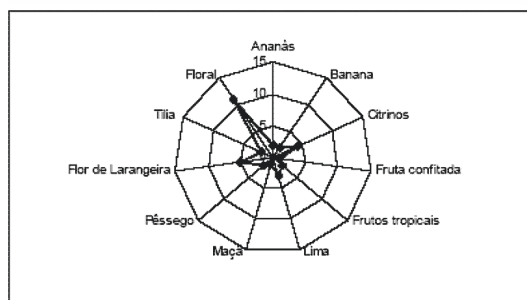


Figura 2 – Aromas identificados no Rabigato

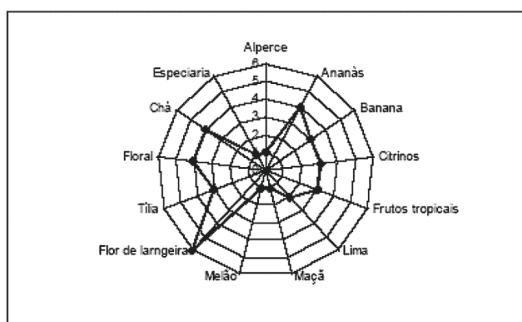


Figura 3 – Aromas identificados na Cercial

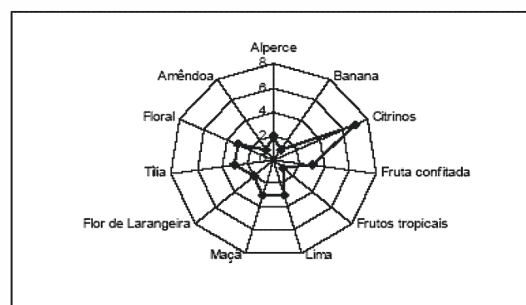


Figura 4 – Aromas identificados na mistura das três castas

Foram quantificados 37 compostos odoríferos nos vinhos das castas Síria, Cercial, Rabigato e na mistura das três castas, distribuídos por diversos grupos conforme se apresenta no Quadro I (entre parênteses indica-se o número de compostos identificados).



Quadro I Concentração, em ug/L, de cada grupo de compostos aromáticos dos vinhos Síria, Rabigato e Cercial, e da mistura das três castas

|                            | Síria    | Rabigato  | Cercial   | Mistura das três castas |
|----------------------------|----------|-----------|-----------|-------------------------|
| Aldeídos (2)               | 6771,45  | 5461,70   | 1026,70   | 8471,51                 |
| Ésteres (19)               | 87840,29 | 91061,21  | 90308,80  | 73109,88                |
| Monoterpenos (1)           | 0,18     | 0,13      | 0,16      | 0,12                    |
| Álcoois (9)                | 70540,04 | 152036,11 | 158935,87 | 133700,70               |
| Ácidos (4)                 | 10006,35 | 19424,69  | 23058,05  | 22030,84                |
| Álcoois Monoterpénicos     | 2,95     | 2,50      | 2,85      | 1,97                    |
| Norisoprenóides em C13 (1) | 0,87     | 3,66      | 3,79      | 3,57                    |

A análise em componentes principais dos perfis de aromas das 3 monocastas e da mistura das três castas permitiu extrair dois componentes principais que descrevem a quase totalidade da variabilidade presente nos dados originais. Na figura 5 encontra-se representada a projecção das amostras no espaço definido pelos dois componentes principais (PC1xPC2). Como se pode observar, a casta Rabigato apresenta um valor negativo no PC1 e a casta Síria e a mistura das três castas apresentam um valor positivo de PC1, com a casta Cercial tendo um valor quase nulo neste PC. O PC2 parece distinguir o perfil aromático dos vinhos obtidos a partir da casta Síria (PC2 negativo) dos perfis de aromas dos vinhos obtidos a partir da casta Cercial e da mistura de castas (PC2 positivo). Por análise da projecção das variáveis originais no mesmo plano definido pelo PC1xPC2, podemos extrair informação dos principais componentes voláteis responsáveis por esta separação. Como se pode observar na figura 6 os aromas correlacionados com valores de PC1 negativos são o álcool isoamílico e o acetato de etilo. Apresentando uma correlação também elevada mas positiva com o PC1 encontra-se o 2-feniletanol. A partir desta análise pode-se deduzir então que os vinhos obtidos a partir da casta Síria e mistura de castas apresentam um conteúdo de 2-feniletanol superior ao das outras duas monocastas. Da mesma forma o vinho obtido a partir da casta Rabigato apresenta um teor mais elevado de acetato de etilo e de álcool isoamílico relativamente às outras castas. Igualmente os vinhos obtidos a partir da casta Cercial e da mistura das castas apresentam um teor de acetato de etilo e/ou menor conteúdo de álcool isoamílico que a casta Síria. Tendo em conta a qualidade das notas aromática fornecidas por estes compostos: 2-feniletanol – aroma a rosas, adocicado, perfumado; [1] Acetato de etilo – aroma a solvente; [1] álcool isoamílico - aroma a álcool, banana, [1] esta análise parece indicar que o vinho obtido a partir da casta Síria poderá apresentar um aroma mais a floral que os vinhos obtidos a partir das duas outras castas, sendo que esta característica está presente também na mistura. Da mesma forma, o vinho obtido a partir das misturas de castas retém as características aromáticas provenientes da casta Cercial, pois apresenta um elevado conteúdo de acetato de etilo e/ou baixo conteúdo de álcool isoamílico, o que pode indicar um aroma menos agradável para o vinho obtido para as misturas de castas quando comparado com o vinho obtido para a casta Síria.

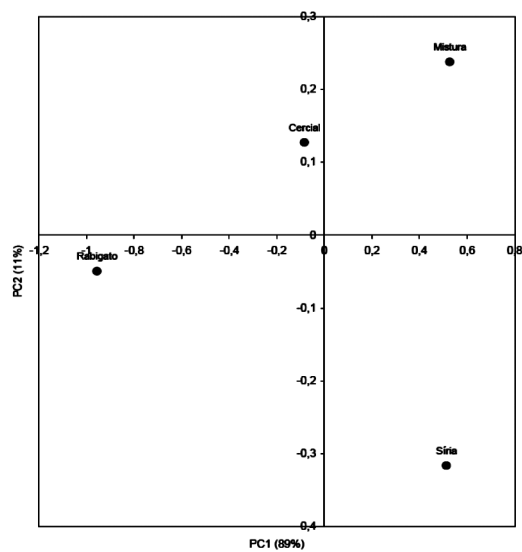


Figura 5 – Projecção das variáveis (vinhos) no espaço definido pelo PC1xPC2

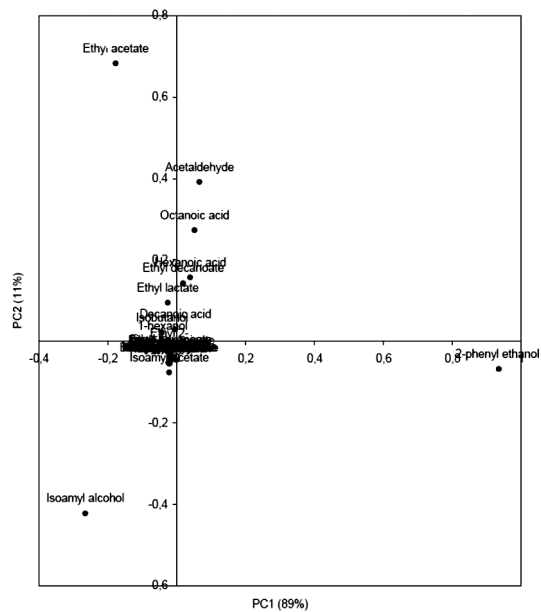


Figura 6 – Projecção das variáveis (vinhos) no espaço definido pelo PC1xPC2

Comparando os resultados das duas análises podemos verificar que o aroma floral foi identificado pelo painel em todos os vinhos, o que a análise cromatográfica comprovou com uma grande quantidade de 2-feniletanol (responsável pelo aroma a rosas), destacando-se a casta Síria com 63,13 mg/l deste composto. Podemos concluir também que os aromas negativos não foram identificados pelo painel, vindo depois alguns deles a ser detectados em grandes quantidades pela análise cromatográfica. Destes compostos podemos destacar o Acetato de etilo (aroma a cola) com valores, mínimo na mistura das três castas de 52,61 mg/l e máximo na casta Rabigato sendo o seu valor de 68,42 mg/l e álcool isoamílico (aroma a solvente) onde a sua quantidade máxima foi obtida na casta Síria (120,18 mg/l) e a sua quantidade mínima na mistura das três castas (82,05 mg/l). Como estes compostos mesmo estando presentes (como comprova a análise cromatográfica), não foram identificados pelo painel de provadores podemos concluir que os aromas positivos destacam-se em relação aos aromas negativos no que diz respeito à análise sensorial o que faz com que os vinhos tenham impressão aromática positiva para o consumidor.

## Referencias

[1]– M.C. Meilgaard (1975) Flavor chemistry of beer. Part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. MBAA Technical Quarterly, 12 (3), 151-168

# COMPORTAMENTO DE TRÊS ESPÉCIES DE COGUMELOS DO GÊNERO *Pleurotus* EMBALADOS EM FILMES POLIMÉRICOS

<sup>1</sup>Sapata, M. M\*.; <sup>1</sup>Ramos, A. C.; <sup>1</sup>Ferreira, A.; <sup>1</sup>Andrada, L.; <sup>1</sup>Candeias, M.; <sup>2</sup>Leitão, A. E.;  
<sup>1</sup>Vasconcellos, F.; <sup>1</sup>Gomes, M. L.

<sup>1</sup>INIAP – Estação Agronómica Nacional, Departamento de Tecnologia dos Produtos Agrários  
Q.<sup>ta</sup> do Marquês, 2784-505 Oeiras,

Tel. +351-214 403 500 Fax. +351- 214 413 208 e-mail: ean- tecnologia@clix.pt

<sup>2</sup>IICT – Departamento de Ciências Naturais

Apartado 3014, 1301-901 Lisboa

Tel. +351- 213 617 247 Fax +351 – 213 617 248 e-mail: cestt@iict.pt

**Palavras chave:** cogumelos, processamento mínimo, embalagem, atmosfera modificada, conservação

**Resumo:** Os cogumelos são alimentos muito perecíveis, com tempo de vida útil limitado, quando mantidos à temperatura ambiente. A elevada taxa respiratória é, um dos fenómenos que constitui maior problema, relativamente ao tempo de conservação. Para além deste, poderão surgir outros, que associados provoquem alterações de comportamento, ou acelerem alterações físico-químicas, sendo mesmo, nalguns casos, induzidos mecanismos de resposta aos danos sofridos.

Os cogumelos do género *Pleurotus* são de cultivo relativamente fácil, de elevada produtividade e alto valor nutritivo, contudo, se a conservação não for efectuada nas melhores condições, podem apresentar-se com fraca aparência e reduzido valor comercial.

As técnicas de frio, associadas ao desenvolvimento de embalagem em atmosfera modificada permitem o controlo do metabolismo activo dos cogumelos frescos, durante a distribuição e conservação, conduzindo a um aumento considerável do tempo de vida útil, sem prejuízo da sua caracterização como "produto fresco".

O objectivo deste estudo foi a avaliação do comportamento, durante a conservação, de três espécies de cogumelos *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* e *P. eryngii* que, embora pertencentes ao mesmo género, apresentam diferentes características morfológicas.

Os cogumelos foram conservados, à temperatura de 4°C, durante 11 dias, em dois tipos de filmes poliméricos de polietileno de baixa densidade (A – Vileda Freshmate e B – 52 LV Amcor), com atmosfera modificada passiva. O controlo de estabilidade foi determinado através de parâmetros fisiológicos e físico-químicos.

Pelos resultados obtidos verificou-se que as espécies *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* apresentaram comportamento idêntico para os dois tipos de filmes até ao sétimo dia. Relativamente à espécie *P. eryngii*, observou-se que os cogumelos embalados nos dois tipos de filme mantiveram o mesmo comportamento, até ao final da conservação.

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de produção de cogumelos do género *Pleurotus* tem vindo a adquirir popularidade, pela facilidade de manipulação, capacidade de desenvolvimento e frutificação em diferentes substratos agrícolas e também por terem elevada adaptabilidade a diversas condições ecológicas. Aliada a estas características, estes cogumelos são uma boa fonte de proteínas, vitaminas e de sais minerais, contendo baixo teor de glícidos e lípidos.

Embora o género *Pleurotus* englobe mais de meia centena de espécies, quase todas comestíveis e muito semelhantes entre si, apenas algumas se encontram actualmente

domesticadas e exploradas industrialmente, destacando-se a *P. ostreatus*, pela sua rusticidade, a *P. sajor-caju* pelo sabor peculiar e a *P. eryngii* pela excelente qualidade e textura.

A conservação pós-colheita destes cogumelos, reveste-se de alguma complexidade, dadas as suas características intrínsecas, nomeadamente composição química e actividade metabólica. Os principais sinais de alteração manifestam-se por alguma desidratação, com perda de turgescência e amolecimento dos tecidos e escurecimento, principalmente quando sofre manipulação (Amodio *et al*, 2003; Moda *et al*, 2005).

Existe, actualmente, uma tendência cada vez maior para os mercados apresentarem vários géneros de cogumelos. Como estes cogumelos são comercializados *en natura*, muitos métodos de conservação têm sido testados no sentido de manterem a qualidade e aumentarem o tempo de vida útil durante a distribuição, conservação e comercialização (Barron *et al*, 2002). Assim, as técnicas de frio, associadas ao desenvolvimento de embalagem em atmosfera modificada permitem o controlo do metabolismo activo dos cogumelos, sem prejuízo da sua caracterização como "produto fresco". O processamento mínimo pode representar, sem dúvida, uma boa oportunidade para tornar estes produtos de alta conveniência (Choi e Kim, 2003).

O objectivo deste trabalho foi a avaliação do comportamento, ao longo de onze dias de conservação, das três espécies de *Pleurotus* referidas, embaladas em dois tipos de filmes poliméricos de polietileno de baixa densidade, com atmosfera modificada passiva, à temperatura de 4°C.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os cogumelos *P. ostreatus* (*P.o.*), *P. sajor-caju* (*P.s.c.*) e *P. eryngii* (*P.e.*) foram produzidos nas instalações piloto do Departamento de Tecnologia dos Produtos Agrários – Estação Agronómica Nacional, em Oeiras. Utilizaram-se cogumelos do primeiro fluxo que, após selecção e higienização, foram colocados (cerca de 120g) em cuvetes B-12 H47 da Ovarpack (PS-EVOH-PE, de 230x144x47 mm, espessura 550µm) que continham no seu interior absorvedores de humidade MP-Ovarpack (12x18 cm). Estas foram seladas com dois tipos de filmes poliméricos de polietileno de baixa densidade (A - Vileda Freshmate e B - 52 LV Amcor), com atmosfera modificada passiva, à temperatura de 4°C, durante 11 dias.

O controlo de estabilidade foi determinado, nos tempos 0, 3, 7, e 11 dias, através de parâmetros fisiológicos e físico-químicos.

*Composição da atmosfera interna das embalagens* - analisador de gases PBI Dansensor - Checkmate 9900; *teor de sólidos solúveis totais* - refractómetro digital ATAGO PR-1; *pH* - potenciómetro Crisonmicro pH2002; *perda de massa* - diferença de massa dos cogumelos no início e no final de cada tempo, expresso em percentagem, com balança de precisão Precisa 400; *textura* - texturómetro Stable Microsystems TA-Hdi, munido com célula de carga de 50N, através de um ensaio de punção, com sonda inox P6 (Ø6mm), à temperatura de 20°C; *cor* - colorímetro Minolta Chroma Meter 200b; *exsudato* - quantidade de líquido libertado por aproximadamente 4g de cogumelo, quando disposto entre folhas de papel de filtro, prensado com peso de 10kg - Salles Torres, durante 10 segundos, expresso em percentagem.

Os resultados foram submetidos a Análise de Componentes Principais (ACP) e de Análise Factorial Discriminante (AFD) recorrendo ao programa Statistica, V.6.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

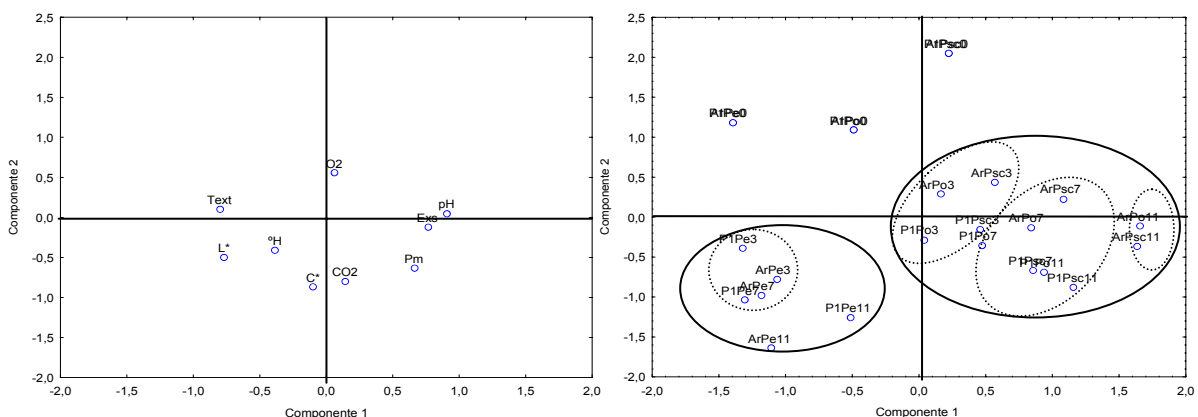
Do ponto de vista fisiológico, até ao terceiro dia, a concentração de O<sub>2</sub> teve um decréscimo de cerca de 36%, nas embalagens de filme A que continham cogumelos *P.s.c.* e *P.e.* e de cerca de 9% nas que continham *P. o.*; os valores de CO<sub>2</sub> passaram para 3%, a partir do qual se mantiveram mais ou menos constantes. Relativamente às embalagens de filme B, e para as

três espécies de cogumelos, os níveis de O<sub>2</sub> mantiveram-se sensivelmente constantes, sendo que, no final da conservação, apresentaram uma diminuição de cerca de 10%; quanto aos níveis de CO<sub>2</sub>, comparativamente aos verificados nas embalagens do filme A, foram ligeiramente superiores. Face aos resultados, pode considerar-se que o equilíbrio fisiológico foi atingido a partir do terceiro dia de conservação, para as espécies de cogumelos estudadas, independentemente do filme de embalagem aplicado.

Quanto à perda de massa a *P. o.* foi a espécie que apresentou maior valor (13,28%), em oposição à *P.e.* (6,57%) durante o período de avaliação, para o filme A. Este facto deve-se à elevada humidade que os cogumelos da espécie *P.o.* apresentavam, deixando-os mais predispostos à desidratação durante a conservação. Na textura verificou-se uma diminuição, em média, de cerca de 43,2% para a espécie *P.o.* e de 48,8% para *P.s.c.*, acompanhada de perda de turgidez, enquanto que a *P.e.* manteve-se praticamente constante, independentemente do filme. O pH e exsudato não evidenciaram variações notórias. Relativamente à cor inicial, todas as amostras de cogumelos evidenciaram aumento progressivo do tom amarelado e pouco definido, registado pelo aumento do valor de b\*, independentemente dos filmes de embalagem. Este amarelecimento ocorre na maior parte dos cogumelos de cor clara, devendo-se principalmente à acção da enzima tirosinase (Gormeley, 1975).

Por ACP verificou-se que as três primeiras componentes, explicam 82,33% da variância total. As variáveis textura, pH, exsudato e luminosidade encontram-se fortemente ligadas à primeira componente (contribuição 36,21%) explicando parcialmente a alteração dos cogumelos, ao longo da conservação. A justificar a segunda componente (contribuição 28,10%) encontra-se o CO<sub>2</sub>, a saturação (C\*) e o O<sub>2</sub> com menor contribuição; a justificar a terceira componente (contribuição 18,02%) a coloração (°H) que explica a influência da concentração em CO<sub>2</sub> na definição da cor dos cogumelos (Fig.1-I).

A distribuição dos pontos experimentais permite distinguir um comportamento diferente entre as três espécies de cogumelos, tendo sido possível, ao longo do tempo considerado, agrupá-las em dois grupos distintos (Fig. 1- II): o primeiro constituído pelas espécies *P.o.* e *P.s.c.* e o segundo constituído apenas pela espécie *P.e.* Relativamente ao primeiro grupo verificou-se uma evolução idêntica de comportamento dos cogumelos, até ao terceiro dia, independentemente do tipo de embalagem.



**Figura 1 - (I)** Análise de Componentes Principais: O<sub>2</sub>- Oxigénio; CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono; Pm- Perda de massa; Text- Textura; pH ; Exs - Exsudato; L\* - Luminosidade;

No entanto, a embalagem de filme B (P1) permitiu preservar melhor as características do produto até ao final, com menor perda de massa e algum amarelecimento, justificada pela proximidade das amostras de *P.o.* e *P.s.c.* de 11 dias com as de 7 dias de conservação.

As amostras embaladas com filme A (Ar) apresentaram um aumento de pH e de exsudato, manifestando elevado sinal de alteração, justificada pelo afastamento das mesmas, relativamente ao filme B (P1).

Quanto ao segundo grupo constituído pela espécie *P.e.* verificou-se que esta apresentou um comportamento idêntico, durante toda a conservação, apenas com uma ligeira modificação da cor no final, independentemente do filme de embalagem utilizado.

Os resultados obtidos são bons indicadores de que estas embalagens de cogumelos em atmosfera modificada trazem efeitos benéficos para a conservação, podendo ser considerado um ponto de partida para uma aplicação comercial, uma vez que as condições atmosféricas normais são adversas, pois aceleram rapidamente a maturação e alteração dos cogumelos. Contudo, em função da temperatura e da humidade relativa, há que ter em conta as especificações dos filmes para que a concentração das misturas gasosas atingidas no equilíbrio, mantenham as características de qualidade do produto.

## Referências

- [1] - M. L. Amodio, G. Colelli, F. M. De Cillis, R. Lovino, L. Massignan - Controlled-Atmosphere storage of fresh-cut 'Cardoncello' mushrooms (*Pleurotus eryngii*). Acta Hort. 599 (2003) 731-735
- [2] - E. M. Moda, M. H. F. Spoto, J. Horii, S. S. Zocchi - Uso de peróxido de hidrogénio e ácido cítrico na conservação de cogumelos *Pleurotus sajor-caju*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 25 (2005) 291-296
- [3] - C. Barron, P. Varoquaux, S. Guilbert, N. Gontard, B. Gouble - Modified atmosphere packaging of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) with hydrophilic films. J. Food Sci. 67 (2002) 251-255
- [4] - M. H. Choi, G. H. Kim - Quality changes in *Pleurotus ostreatus* during modified atmosphere storage as affected by temperatures and packaging material. Acta Hort. 628 (2003) 357-362
- [5] - R. Gormley - Chill storage of mushrooms. J. Sci. Food Agric. 26 (1975) 401-411

## Agradecimentos

INIAP – Proj. PIDDAC nº 122/05: “Aumento do tempo de vida útil de cogumelos frescos do género *Pleurotus* embalados em atmosfera modificada”.

# CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA MATURAÇÃO FENÓLICA DE UVAS DE DIFERENTES CASTAS PRODUZIDAS NA QUINTA MORGADO DA TORRE – ALGARVE

Gonçalves, C<sup>1</sup>., Neves, A.C<sup>1</sup>., Mendes, J<sup>2</sup>., Galego, L.R.<sup>1\*</sup>,

1- Escola Superior de Tecnologia, Área Departamental de Engenharia Alimentar - Universidade do  
Algarve, Campus da Penha, 8005-139 FARO

Tel + 351- 289 800 124 Fax +351 289 888 405 e-mails: [a25554@ualg.pt](mailto:a25554@ualg.pt); [a26245@ualg.pt](mailto:a26245@ualg.pt)  
[lgalego@ualg.pt](mailto:lgalego@ualg.pt)

2 - Morgado da Torre, Apartado 8501-903 PORTIMÃO – [gmt@sapo.pt](mailto:gmt@sapo.pt)

**Palavras-chave:** uvas, maturação, compostos fenólicos

**RESUMO:** Nos últimos anos tem sido dada particular atenção à evolução dos compostos fenólicos durante a maturação das uvas quer pela importância que os mesmos apresentam relativamente às sensações gustativas, quer devido à sua função no envelhecimento dos vinhos.

Neste trabalho foi iniciado o estudo da evolução de características das uvas provenientes das castas tintas: *Aragonez* (A), *Cabernet Sauvignon* (C), *Syrah* (S) e *Trincadeira* (T). Nas mesmas castas foi feita uma poda de forma a deixar apenas um cacho por vara em parte da vinha (com tratamento – C, sem poda - sem tratamento – S). Semanalmente, de 24 de Julho a 28 de Agosto de 2006, foram colhidas aleatoriamente amostras de 2 kg de uvas de cada casta e de cada tratamento.

As características analisadas foram: massa, diâmetro, pH, grau Brix, acidez total, iões potássio, fenóis totais em películas e grainhas, taninos em grainhas e antocianinas em película.

A extração dos compostos fenólicos foi feita de acordo com o método descrito por Esteban *et al.* [1] o doseamento das antocianinas foi feito usando a descoloração pelo ácido sulfuroso descrito por Ribéreau-Gayon, e Stonestreet, [2], o dos polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu [3, 4] e dos taninos baseado na característica das proantocianidinas monómeras ou polimerizadas originarem antocianidinas, por aquecimento em meio ácido [3].

Pode verificar-se que o máximo de antocianinas se obteve na quarta semana e o dos polifenóis nas películas na quinta semana. Nas grainhas verifica-se um constante decréscimo durante as seis semanas de análise. Os taninos apresentam um máximo na 6 semana para as duas castas onde existiu poda uma semana antes do início do estudo.

## 1. INTRODUÇÃO

O Algarve surge como a primeira região do país que adoptou os hábitos alimentares mediterrânicos, com a triologia, cereais, vinho e azeite, na sequência dos contactos com comerciantes consumidores de vinho: Fenícios, Gregos, Cartagineses e Romanos. Logo no início da nossa era o Algarve já tinha grandes explorações agrárias tipicamente mediterrânicas onde se cultivava a vinha e se produzia o vinho segundo um modelo tipicamente italiano [5].

Com naturais variações a vinha sempre esteve bem presente por toda a região ao longo dos séculos, tendo sofrido grandes oscilações durante o século XX, entrando mesmo em franco declínio nos anos 80. A chegada do século XXI faz ressurgir um novo modelo de produção de vinhos na região, os vinhos de Quinta. No presente além das tradicionais adegas de Lagos e Lagoa, o Algarve conta com 12 modernas Quintas a produzir vinhos seguindo metodologias inovadoras. A Quinta Morgado da Torre, a mais antiga das 12, com 30 hectares em solos argilo-calcários, numa zona de poucas chuvas, longos períodos de exposição solar, protegida do vento norte pela Serra de Monchique e que recebe a influência das brisas marítimas, reúne condições para a produção de vinhos com excelente qualidade. Este estudo é um primeiro passo no sentido de otimizar a produção aliando as condições edafoclimáticas, as tradições, as novas tecnologias e algum conhecimento das características das uvas por castas e/ou por tratamento.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Poda**

De cada casta (*Aragonez*, *Cabernet Sauvignon*, *Syrah* e *Trincadeira*) a metade das cepas foi feita uma poda de forma a ficar um cacho por vara, na outra metade foram deixados todos os cachos.

### **2.2. Amostragem**

As amostras foram colhidas pelas 8 h da manhã, num mínimo de dez pés aleatoriamente escolhidos nas diferentes filas e com diferentes orientações solares. Foram transportadas para o laboratório em geleiras de modo a manterem a temperatura entre 1 e 5 °C [1]. No laboratório separaram-se cuidadosamente lotes de 25 bagos de cada casta [6]. A recolha das amostras foi efectuada desde 24 de Julho, semanalmente às Segundas-feiras durante 6 semanas.

### **2.3. Extração**

Procedeu-se à separação das películas, polpa e sementes com o auxílio de um bisturi a fim de se perderem o mínimo de compostos da película. As películas e as sementes foram colocadas em erlenmeyeres, separadas, revestidos por película de alumínio e contendo uma solução de acetona a 66 % (V/V). Foram colocados com agitação durante 12 h. Passado este tempo foi feita a evaporação da acetona num banho de água a 40 °C. Terminada a evaporação foi medido o volume de extracto e adicionado igual volume de um vinho sintético, obtendo-se o extracto final com o qual se fizeram as análises [7].

### **2.4. Doseamento dos taninos**

O doseamento dos taninos foi feito de acordo com o método descrito no regulamento (CEE) nº 2679/90 [3].

### **2.5. Doseamento das Antocianinas totais.**

O doseamento das antocianinas totais foi feito pelo método de descoloração pelo ácido sulfuroso descrito por Ribéreau-Gayon e Stonestreet [5].

### **2.6. Doseamento dos polifenóis totais**

O doseamento dos polifenóis totais foi feito de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito no regulamento (CEE) nº 2679/90 [4].

### **2.7. Doseamento dos iões potássio**

O doseamento dos iões potássio foi efectuada com o auxílio de um Fotómetro de Chama Jenway, recorrendo à preparação de um conjunto de padrões a partir da uma solução de referência com a concentração de 500 ppm. A análise foi feita no sumo, filtrado, obtido por esmagamento de uvas sem grainha e às cinzas de bagos de uvas sem grainhas.

### **2.8. Determinação da acidez total, grau Brix e pH**

A acidez total, o grau Brix e o pH foi determinada no sumo, filtrado, obtido da polpa dos bagos de uva, pelos métodos descritos nos pelo OIV [4].

## **3 RESULTADOS**

A análise dos resultados aqui indicada refere-se aos resultados mais importantes para o estudo da evolução fenólica das uvas, quer graficamente por semana/tratamento, quer recorrendo à análise de grupos com recurso ao programa NTYSYS [8].

A figura 1 mostra a evolução do índice de antocianinas por grama de película, observa-se um aumento em todas as castas, com tratamento (C) ou sem tratamento (S) até à 4ª semana.

Na figura 2 representa-se uma análise por grupos, dos mesmos dados, tendo sido considerados 8 objectos (castas/tratamento) e 6 variáveis (análise do índice de antocianinas totais nas 6 semanas). Pode observar-se que as castas *Aragonez* e *Cabernet Sauvignon* com tratamento formam um grupo e que as castas *Syrah* e *Trincadeira* com tratamento formam outro grupo. De salientar que o tratamento a estas duas últimas castas foi efectuada uma semana antes do tratamento das outras duas castas.

A figura 3 mostra uma análise de grupo considerando os mesmos 8 objectos e 36 variáveis, resultantes das seis semanas de análise com 6 parâmetros (índice de antocianinas totais, acidez total, iões potássio, grau Brix, pH e taninos). Pode verificar-se que neste caso prevalece a formação de grupos por casta.



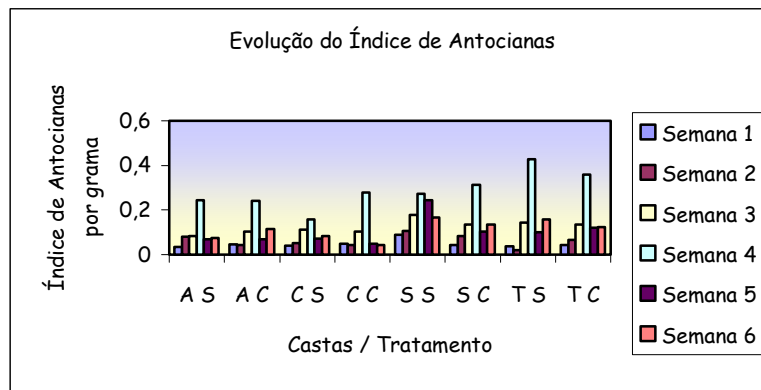


Figura 1 – Representação da evolução do índice de antocianinas por grama de película durante as 6 semanas de análise.

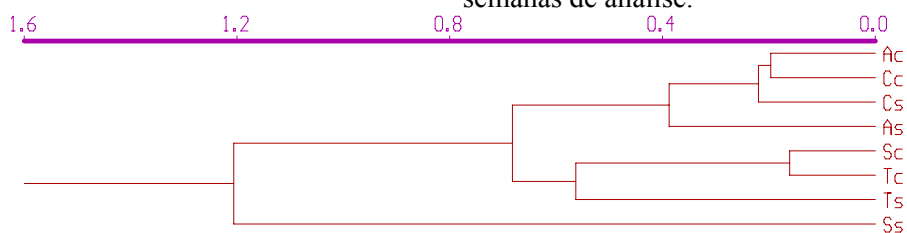


Figura 2 – Dendrograma representativo do índice de antocianinas por grama de película das castas analisadas ao longo das seis semanas

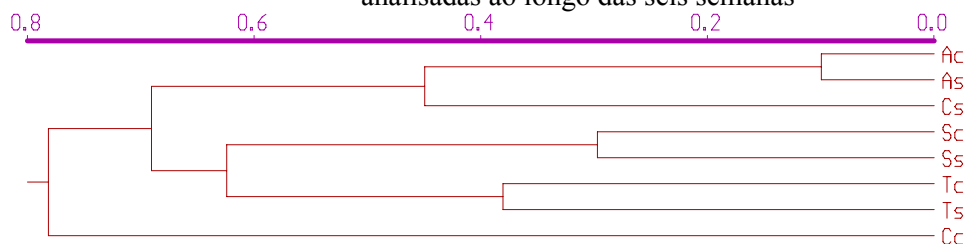


Figura 3 – Dendrograma que representa a relação entre índice de antocianinas totais, acidez total, iões potássio, grau Brix, taninos durante 6 semanas das diferentes castas com e sem tratamento

A figura 4 mostra a evolução do índice de polifenóis totais nas películas durante as semanas de estudo, não estão apresentados os resultados da 4ª semana, por ter existido um problema com reagentes. Excepção feita para a casta *Trincadeira* com tratamento em todas as outras se observa um decréscimo a partir da 5ª semana.

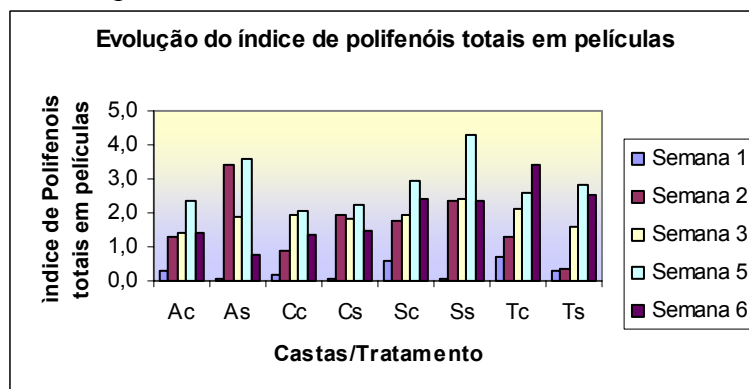


Figura 4 – Evolução do índice de polifenóis totais em películas durante as 6 semanas de análise.

A figura 5 mostra a evolução do índice de polifenóis totais em grainhas durante as 6 semanas de estudo. Pode observar-se uma tendência para a descida do índice de polifenóis totais.

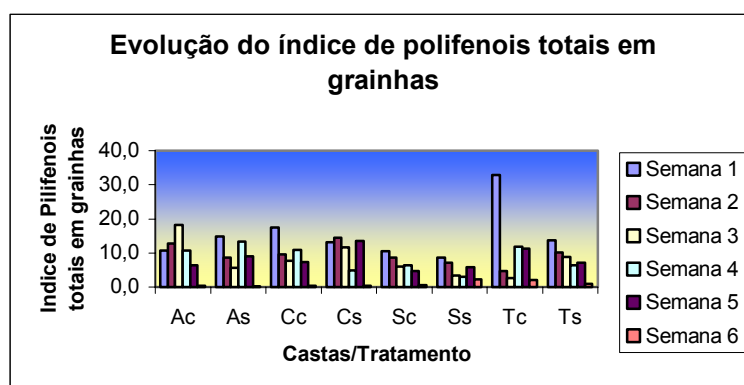


Figura 5 – Evolução do índice de polifenóis totais em grainhas durante as 6 semanas de análise.

Os resultados indicam que para obter vinhos com o máximo de antocianinas a vindima devia ter sido feita em meados de Agosto. Embora os polifenóis totais das películas mostrem uma tendência para aumentar até à 5 semana, nas grainhas apresentam tendência para decrescer na maioria das situações estudadas desde o início do estudo, o que está de acordo com bibliografia [9]. Este estudo tem que ser repetido durante alguns anos para ser possível prever a melhor data para a vindima, face às variações que a vinha anualmente está sujeita. Durante o período em estudo, choveu com intensidade pouco usual na região o que origina alterações consideráveis nas características das uvas.

## Referências

- [1]- M.A., Esteban, M.J. Villanueva, J.R., Lissarrague Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. J. S. Food and Agriculture **81**(2001), 409-420.
- [2] - P. Ribéreau-Gayon, e E. Stonestreet, (1965) e (1966). In: Controlo de qualidade dos vinhos, A.S. Curvelo-Garcia, Instituto da Vinha e do Vinho.
- [3] - OIV, (1981). Regulamento (CEE) N° 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro de 1990.
- [4] - Recueil des Methodes Internationales D'analyse des Vines et des Moust, International Organisation of Vine and Wine OIV, 2006.
- [5] - J.P. Bernardes, L.F. Oliveira, A “Descoberta” do vinho. In: A vinha e o vinho no Algarve O renascer de uma velha tradição, Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve, 2006.
- [6] - R. Delgado, P. Martín, M. Álamo, M. González (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84:623-630.
- [7] - G. Roby, J.F., Harbertson, D.A. Adams, M.A. Matthews. Berry size and vine water deficits as factors in wine grape composition: Anthocyanins and Tannins, Australian Journal of Grape and Wine Research 10, (2004), 100-107.
- [8]- F.J. Rohlf, “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” Version 1,80, Exeter Software, New York, 1995.
- [9] - J.H. Togoeres, Tratado de Enologia – Tomo 1, Edições Mundi-Prensa Madrid, 2003.

# DETERIORAÇÃO DA CARNE DE PERU EMBALADA EM AEROBIOSE E EM ATMOSFERA MODIFICADA SUA RELAÇÃO COM OS TEORES DE AZOTO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL

*Fraqueza, M.J.\*, Ferreira, M.C., Barreto, A.S.*

Faculdade de Medicina Veterinária. CIISA. U.T.de Lisboa. Av. da Universidade Técnica. Polo Universitário. Alto da Ajuda. 1300-477 Lisboa. Portugal. email: mjoaofraqueza@fmv.utl.pt

**Palavras chave:** carne de peru, atmosfera modificada, cor, prazo de validade, ABVT

## RESUMO

Este estudo teve como objectivos a determinação do prazo de validade de carne de peru de diferentes categorias de cor em aerobiose e atmosfera modificada e o estabelecimento de uma relação entre a qualidade microbiológica da carne e o azoto básico volátil total (ABVT). Os peitos de carcaças de peru foram seleccionados através dos parâmetros Luminosidade (L) e pH:  $L \geq 51$  e  $pH < 5,8$  para cor clara,  $43 < L < 51$  para cor intermédia,  $L \leq 43$  e  $pH > 5,8$  para cor escura. As amostras de carne fatiada (peitos de peru fatiados) providas de diferentes dias de colheita, foram embaladas individualmente: um grupo em aerobiose e outro em atmosfera modificada (MAP) contendo a mistura de gases 50%N<sub>2</sub> e 50%CO<sub>2</sub>. As amostras foram armazenadas no escuro em refrigeração ( $0 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O grupo de amostras embaladas em aerobiose foi avaliado em relação às suas características microbiológicas e foi determinado o azoto básico volátil total aos 0, 5 e 12 dias de armazenamento, prolongando-se essa avaliação para as amostras embaladas em atmosfera modificada até aos 19 e 25 dias. A carne de cor escura com 12 dias de armazenamento a  $0^\circ\text{C}$  em aerobiose apresentou contagens significativamente mais elevadas de aeróbios a  $30^\circ\text{C}$ , psicrótróficos e ABVT do que a carne de outras categorias. O período de validade microbiológico da carne de peru fatiada embalada em MAP prolongou-se durante mais uma semana na carne de cor clara e intermédia (20 dias) do que na escura nas condições deste estudo. Valores de ABVT de 20-30 mg NH<sub>3</sub>/100 mg de carne de peru correspondem a estados avançados de deterioração da carne, indicando-se como limite de aceitabilidade na carne de peru crua fresca valores de ABVT de 14 mg de NH<sub>3</sub>/100mg.

## 1.INTRODUÇÃO

Como alternativa à embalagem em aerobiose surgiu a embalagem em atmosfera modificada utilizada frequentemente no segundo nível de transformação grossista das carnes de porco e bovino e mais recentemente na carne de aves. Esta inovação permitiu aumentar o período de validade da carne, melhorar a apresentação, facilitar a armazenagem, distribuição, venda e utilização pelos consumidores. Contudo, o sucesso da aplicação desta tecnologia está dependente de vários factores como a composição da mistura gasosa, a natureza e qualidade inicial da carne, o controlo da temperatura, as propriedades de barreira da embalagem e a eficácia do equipamento utilizado.

A necessidade de decidir quando o fim do período de validade da carne própria para consumo é atingido é premente; recorrendo-se a várias métodos para tomar essa decisão ou para prever com algum rigor o fim desse período. A contagem de determinados microrganismos envolvidos na deterioração é um método sensível mas requer dois ou mais dias para a incubação e identificação de estirpes. Apesar disso, pode ajudar na determinação da frescura e previsão da durabilidade, ao fornecer um conhecimento do comportamento dos microrganismos que são quantificados. A relação da deterioração provocada pela multiplicação bacteriana e indicadores químicos que a revelem poderá ser um recurso para a decisão ou previsão com algum rigor do fim do período de validade.

O objectivo deste trabalho foi determinar o prazo de validade de carne de peru de diferentes categorias de cor em aerobiose e atmosfera modificada, numa mistura de 50% CO<sub>2</sub> e 50% N<sub>2</sub>,

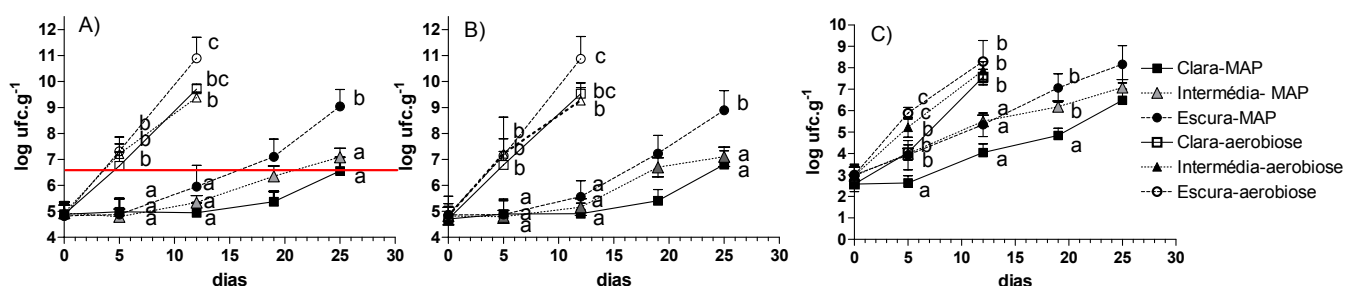
e o estabelecimento de uma relação entre a qualidade microbiológica da carne de peru e o parâmetro bioquímico azoto básico volátil total.

## 2.MATERIAL E MÉTODOS

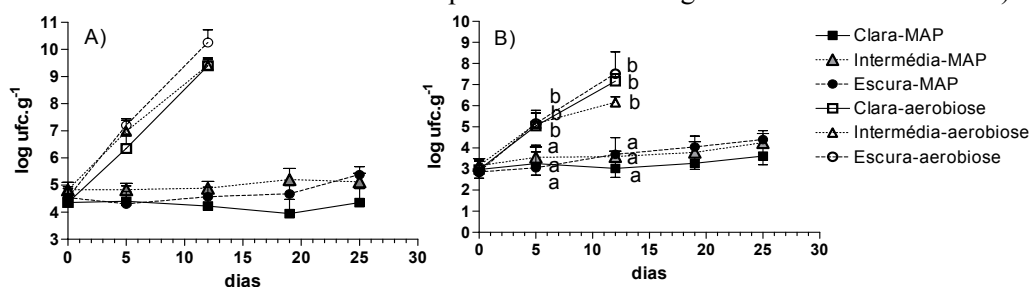
A avaliação da qualidade da carne de peru foi efectuada pela medição do pH<sub>24</sub> (24 h *postmortem*) e da cor (às 24 h *postmortem*)<sup>[1]</sup>. Os peitos foram seleccionados de acordo com a Luminosidade (L) e pH: L $\geq$ 51 e pH $<$ 5,8 para cor clara, 43 $<$ L $<$ 51 para cor intermédia, L $\leq$ 43 e pH $>$ 5,8 para cor escura. Dos músculos do peito correspondentes às três classes de cor definidas foram feitos escalopes. A carne fatiada foi colocada em saco de polietileno e transportada para o laboratório em caixa isotérmica, em menos de uma hora. Amostras de carne fatiada providas de diferentes dias de colheita, foram embaladas individualmente: um grupo em aerobiose (utilizando barquetes de polipropileno (Tecknopack plastics, S/L, Barcelona) envolvidas por película estirável de policloreto de vinilo e outro em atmosfera modificada (MAP) contendo a mistura de gases 50%N<sub>2</sub> e 50%CO<sub>2</sub>, utilizando-se sacos “HBX-070” (EVOH, R.Bayer, Alemanha) termosoldados numa máquina EVT-7-CD (Tecnoprip, Barcelona). As amostras foram imediatamente armazenadas no escuro em refrigeração (0 $\pm$ 1°C) durante 12 e 25 dias. O grupo de amostras em aerobiose foi avaliado em relação às suas características microbiológicas e foi determinado o azoto básico volátil total (NP-1848,1987) aos 0, 5 e 12 dias de armazenamento, prolongando-se essa avaliação para as amostras embaladas em atmosfera modificada até aos 19 e 25 dias. Para cada condição de embalagem efectuou-se no mínimo cinco repetições em diferentes dias de ensaio. Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem de aeróbios totais a 30°C conforme NP-1995 (1982); contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos de acordo com NP-2307 (1987); contagem de microrganismos anaeróbios psicrotróficos em meio de cultura Brewer Anaerobic Agar (Merck, Alemanha), após incubação em anaerobiose utilizando geradores Anaerocult A (Merck, Alemanha), a 6,5°C $\pm$ 0,5°C durante 10 dias; contagem de *Enterobacteriaceae* de acordo com NP-4137 (1991); contagem de *Pseudomonas spp.* após sementeira de 0,1ml de cada diluição à superfície do meio de cultura para Pseudomonas CFC (cefaloridina, fucidina e cetrimida agar base; Oxoid, Inglaterra), em quintuplicado, após incubação a 30°C durante 48h ; contagem de bactérias do ácido láctico em anaerobiose, a 30°C durante 3 dias, meio de cultura MRS (Man Rogosa Sharpe agar; Oxoid, Inglaterra); contagem de *Brochotrix thermosphacta* (ISO 13722, 1996). Os resultados das contagens foram expressos em logaritmo das unidades formadoras de colónias por grama (log ufc.g<sup>-1</sup>). A análise estatística dos resultados foi efectuada utilizando-se o programa SPSS 11.5 para Windows.

## 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

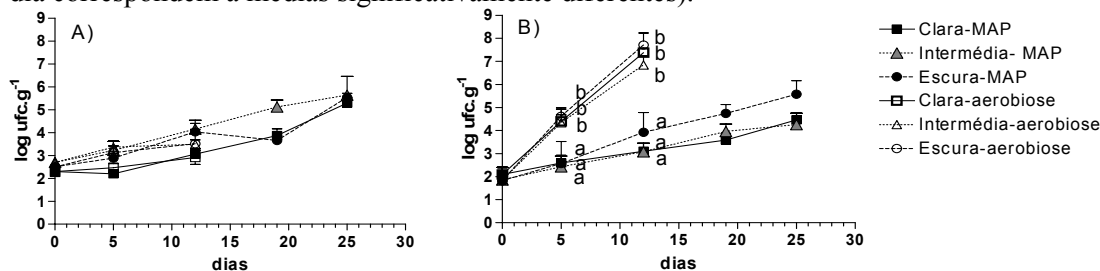
A evolução da flora microbiana durante o armazenamento a 0°C da carne de peru fatiada, de diferentes categorias de cor, embalada em aerobiose e MAP (50% CO<sub>2</sub> e 50% N<sub>2</sub>) está representada nas Figuras 1 a 3. Nas amostras de carne de diferentes categorias de cor embaladas em aerobiose após doze dias de armazenamento observaram-se diferenças significativas nos teores de microrganismos aeróbios mesófilos totais e psicrotróficos. A carne de cor escura apresentou contagens significativamente mais elevadas do que as outras categorias de cor. Os restantes grupos microbianos analisados não mostraram ser muito afectados pelas diferenças de pH iniciais das amostras, de forma a que se registassem diferenças significativas na velocidade de crescimento das populações e nas contagens finais. O efeito inibitório do CO<sub>2</sub> foi evidente quando se observou a redução significativa na contagem de flora aeróbia gram-negativa na carne embalada em atmosfera modificada comparativamente à carne embalada em aerobiose. O crescimento de *Pseudomonas spp.* e *Enterobacteriaceae* foi inibido na carne em MAP (Figura 2).



**Figura 1:** Evolução da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais (A) psicotróficos (B) e anaeróbios (C) na carne de peru fatiada de cor clara, intermédia e escura durante o armazenamento a 0°C (<sup>abc</sup> diferentes letras no mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes).



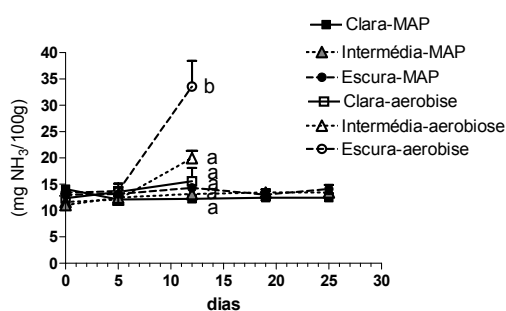
**Figura 2:** Evolução da contagem de *Pseudomonas* spp. (A) e *Enterobacteriaceae* (B) na carne de peru fatiada de cor clara, intermédia e escura durante o armazenamento a 0°C (<sup>abc</sup> diferentes letras no mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes).



**Figura 3:** Evolução da contagem de bactérias do ácido láctico (A) e *Brochothrix thermosphacta* (B) na carne de peru fatiada de cor clara, intermédia e escura durante o armazenamento a 0°C (<sup>abc</sup> diferentes letras no mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes).

O crescimento da bactéria *Brochothrix thermosphacta* efectuou-se de modo idêntico nas diferentes categorias de carne de peru fatiada embalada em MAP, porém apesar de não existirem diferenças significativas entre elas, as carnes mais escuras atingiram contagens com uma diferença superior a 1 log ufc.g<sup>-1</sup> em relação às de cor clara e intermédia no 25º dia de refrigeração (Figura 3B). O pH da carne de peru associado à cor que esta apresenta não teve efeito no desenvolvimento das bactérias do ácido láctico. Contudo, outras bactérias aeróbias facultativas psicotróficas cresceram na carne de cor escura embalada em atmosfera modificada com 50% CO<sub>2</sub> e 50% N<sub>2</sub> quando *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* foram inibidas sendo responsáveis pela deterioração da carne. O seu desenvolvimento foi promovido por condições intrínsecas relacionadas com a carne escura com pH igual ou superior a 6 e pelo seu conteúdo em micronutrientes, nomeadamente ferro<sup>[2]</sup>.

O valor médio inicial do ABVT para a carne de peru foi de 12,42±2,08 mg NH<sub>3</sub>/100g (Figura 4). Não se registaram aumentos do ABVT ao longo do tempo de armazenamento na carne de cor clara mas nas amostras de cor intermédia e escura, com especial relevância nesta última, ocorreu um aumento significativo (p<0,05) do 5º para o 12º dia de armazenamento.



**Figura 4:** Evolução do azoto básico volátil total na carne de peru fatiada de cor clara, intermédia e escura, em aerobiose e atmosfera modificada ao longo do tempo de armazenamento a 0°C (<sup>abc</sup> letras no mesmo dia correspondem a médias significativamente diferentes).

As amostras de cor intermédia e escura ao 12º dia em aerobiose ultrapassaram o valor referido como limite de aceitabilidade na carne de vaca, 16,5mg NH<sub>3</sub>/100g de carne<sup>[3]</sup>. A carne de peru em MAP, não apresentou diferenças significativas nos valores de ABVT nem entre categorias de cor, nem ao longo do tempo de armazenamento, tendo-se obtido como valor médio 12,93±2,10 mg NH<sub>3</sub>/100g. A correlação encontrada entre o teor de ABVT e os grupos microbianos analisados embora sendo moderada, associa parte da produção de NH<sub>3</sub> ao metabolismo de microrganismos psicrótróficos, relacionando as *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* com a maior produção de NH<sub>3</sub>. Os valores médios de ABVT na carne de peru quando esta não apresenta sinais de alteração nem teores de flora microbiana superiores a 10<sup>6</sup> ufc.g<sup>-1</sup> rondam os 13 mg de NH<sub>3</sub>/100mg. Este valor foi mais baixo do que o indicado para a carne crua fresca refrigerada em bom estado de conservação, 20 mg de NH<sub>3</sub>/100mg<sup>[4]</sup>, no entanto a regra de que o dobro da concentração corresponde a estados de putrefacção avançada aplica-se pois valores de 20-30 mg de NH<sub>3</sub>/100mg na carne de peru surgiram em estados de putrefacção avançada indicando-se como limite de aceitabilidade na carne de peru crua fresca valores de ABVT de 14 mg de NH<sub>3</sub>/100mg.

#### 4. CONCLUSÕES

A carne de cor escura com 12 dias de armazenamento a 0°C em aerobiose apresentou contagens significativamente mais elevadas de aeróbios a 30°C, psicrótróficos e ABVT do que a carne de outras categorias. O período de validade microbiológico da carne de peru fatiada embalada em MAP prolongou-se durante mais uma semana na carne de cor clara e intermédia (20 dias) do que na escura nas condições deste estudo. Valores de ABVT de 20-30 mg NH<sub>3</sub>/100 mg de carne de peru correspondem a estados avançados de deterioração da carne, indicando-se como limite de aceitabilidade na carne de peru crua fresca valores de ABVT de 14 mg de NH<sub>3</sub>/100mg.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] Fraqueza, M.J., Cardoso, A.S., Ferreira, M.C., Barreto, A.S. 2006. Incidence of light and dark color turkey breast muscles (*pectoralis major*) in a Portuguese slaughterhouse. *Poultry Science*, **85**:1992-2000.
- [2] Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B. and Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. of Food Microbiology*, **78**:79-97.
- [3] Mathews, S., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R. (1990). Chemical indices of food decomposition. *Tr. in Food Science & Tech.*, **10**:-91.
- [4] Regra Técnica P.O.A. nº1/81 (1981). Controlo de qualidade. Azoto básico volátil total. Interpretação dos resultados. Instituto Qualidade Alimentar. Lisboa. 4p.

# DETERMINAÇÃO DA RAZÃO AMILOSE/AMILOPECTINA DE AMIDOS COMERCIAIS POR FTIR

*Lima<sup>1</sup>, A.D.; Costa<sup>1</sup>, A.L.; Santos<sup>1</sup>, J.; Cabral<sup>1</sup>, L.; Barros<sup>1</sup>, A.; Barros<sup>2</sup>, A.; Nunes<sup>1</sup>, F.M.*

<sup>1</sup> – Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000 Vila Real,  
Tel:259350242; e-mail: fnunes@utad.pt

<sup>2</sup> – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3800 Aveiro  
Tel:234372581; e-mail: antbarros@dq.ua.pt

**Palavras-chave:** Amido, razão amilose/amilopectina, FTIR, PLS

**Resumo:** Neste trabalho foi desenvolvido um método multivariado (PLS) para a quantificação rápida da percentagem de amilose em misturas de amilose e amilopectina. Este método apresenta a vantagem de uma manipulação reduzida da amostra, carácter não destrutivo do processo. A análise dos coeficientes b, permitiu verificar que este método de calibração assenta nas diferentes características estruturais dos dois polímeros.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitas das propriedades do amido tais como, características de gelatinização e gelificação, solubilidade, formação de amido resistente, e características estruturais e de cozimento dos vários alimentos ricos em amido, dependem da sua razão amilose/amilopectina.

A determinação do conteúdo de amilose dos amidos é um importante parâmetro de qualidade para o processamento do amido, sendo vulgarmente quantificado por determinação da capacidade de ligação de iodo (determinação potenciométrica, amperométrica e colorimétrica). No entanto estes métodos apresentam algumas desvantagens, já que também a amilopectina é capaz de formar complexos com o amido, reduzindo desta forma a concentração de iodo livre, interferindo na determinação potenciométrica e amperométrica. De igual forma, também estes complexos amilopectina-iodo podem absorver comprimentos de onda semelhantes aos observados para os complexos amilose-iodo, interferindo desta forma com as determinações colorimétricas.

Outra forma alternativa da medição da razão amilose/amilopectina, explora a formação específica de complexos de amilopectina com a concavalina A. Este método não apresenta as limitações dos métodos de complexação de iodo, no entanto necessita da separação da amilopectina especificamente precipitada com a concavalina A e determinação da amilose que permanece no sobrenadante após hidrólise enzimática e determinação da glucose libertada.

A utilização do FTIR para a determinação da razão amilose/amilopectina apresenta as vantagens inerentes ao método, rapidez, especificidade e carácter não destrutivo da amostra. Desta forma desenvolveu-se um método de espectroscopia de infravermelho, utilizando o método de regressão parcial em mínimos quadrados (PLS1) para a determinação da razão amilose/amilopectina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas para a elaboração da curva de calibração foram obtidas por mistura de diferentes proporções de amilose e amilopectina da batata (Sigma) após solubilização com NaOH 2M, neutralização com HCl 2M até pH 7, congelação e liofilização.

Os espectros foram obtidos em triplicado na forma de pastilhas de KBr na gama de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de FTIR obtidos para as diferentes misturas de amilose e amilopectina apresentaram o aspecto típico de polissacarídeos. A região entre 800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  apresenta um conjunto de bandas sobrepostas.

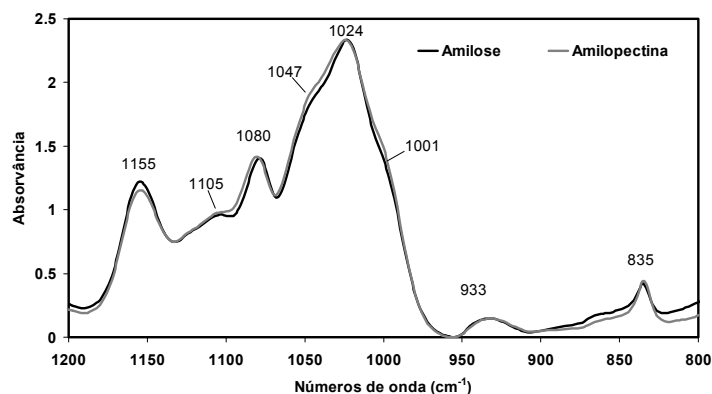


Figura 1 – Espectro de FTIR obtido para amostras de amilose e amilopectina.

Na tabela 1 encontram-se as atribuições das bandas às características estruturais/moleculares destes polissacarídeos de acordo com os dados presentes na literatura.

Tabela 1 – Atribuição das bandas no infravermelho médio da amilose e amilopectina <sup>1,2</sup>

| $\text{cm}^{-1}$ | Atribuição da banda  |  |
|------------------|--|--|
| 835              | Vibração $\text{C}_1\text{--H}$ características de anómeros $\alpha$   |  |
| 933              | Vibrações da ligação glicosídica $\text{C}_1\text{--O--C}_4$ com configuração $\alpha$   |  |
| 1001             | Vibrações de torsão $\text{C}_6\text{--OH}$ (no caso da amilose indica um fortalecimento das interações intercadeia via ligação de hidrogénio)                     | Vibrações das ligações de valência $\text{C--O}$ e $\text{C--C}$ e vibrações de deformação das ligações $\text{CCH}$ , $\text{COH}$ e $\text{HCO}$ |
| 1024             | Bandas fortemente associadas com alterações na ordem molecular (relacionadas com fases cristalinas e amorfas nos espectros de amido)                               |  |
| 1047             |  |  |
| 1080             | Vibrações complexas envolvendo o alongamento da ligação $\text{C}_6\text{--O}_6$ com a participação de vibrações de deformação da ligação $\text{C}_4\text{--C}_5$ |  |
| 1105             | Vibração da ligação $\text{C}_4\text{--O}$ dos resíduos de glucose   |  |
| 1155             | Vibrações de alongamento exo-cíclicas $\text{C--O}$  |  |



Um dos problemas frequentes na utilização do FTIR para a análise quantitativa é a linha de base nos espectros obtidos, a qual pode variar de forma significativa, diminuindo desta forma o poder de previsão dos modelos de regressão. De forma a reduzir este problema, utilizaram-se os espectros de primeira derivada para o desenvolvimento dos modelos de calibração.

Na figura 2 apresentam-se os espectros médios de primeira derivada das amostras analisadas na gama de 0 a 100% de amilose. Existem vários números de onda para os quais se verifica uma alteração da forma do espectro. Para se verificar se estas alterações observadas são significativas, realizou-se um teste de F entre a variabilidade observada para cada amostra e a variabilidade entre amostras (Figura 3).

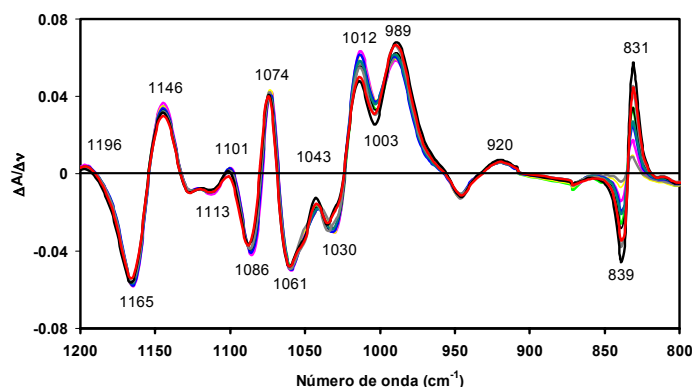


Figura 2 – Espectros de primeira derivada das amostras com diferentes percentagens de amilose (0 a 100%) e amilopectina (0 a 100%).

Através desta análise verifica-se que as variações observadas nos espectros de primeira derivada nas zonas de 1196, 1159, 1144, 1107, 1095, 1082, 1072, 1051, 1043, 1038, 1030, 1001, 991, 922, 841, 833  $\text{cm}^{-1}$ , são significativas ( $p=0,05$ ) entre as amostras analisadas com diferente conteúdos de amilose.

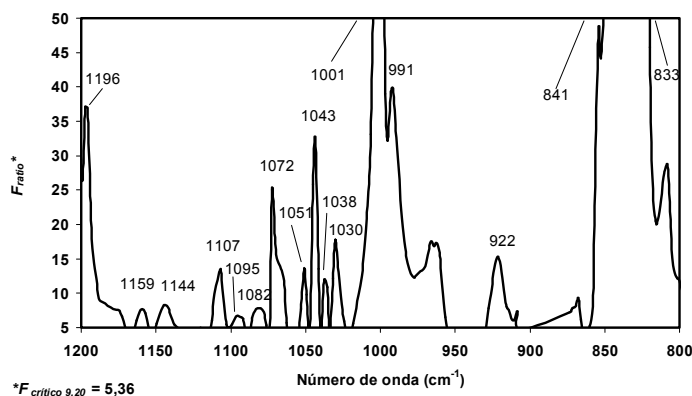


Figura 3 – Teste de F entre a variabilidade dos espectros de primeira derivada dentro da mesma amostra e variabilidade entre amostras com diferentes percentagens de amilose (0 a 100%) e amilopectina (0 a 100%).

Utilizou-se a regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) para desenvolver o modelo de calibração. O coeficiente de correlação do modelo obtido entre o valor real e o valor observado foi de 0,954 com três variáveis latentes. Na figura 4 encontram-se os coeficientes b obtidos no modelo de regressão.

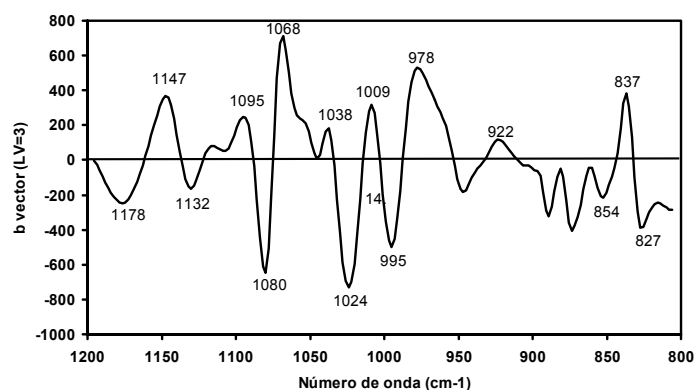


Figura 4 –Coeficientes b obtidos por PLS entre o conteúdo de amilose os espectros de primeira derivada.

Os coeficientes b reflectem as alterações anteriormente observadas nas Figuras 2 e 3, embora os pesos atribuídos às diferentes regiões do espectro não sejam semelhantes às observadas na Figura 3. No entanto estas diferenças são explicadas pela diferente natureza das análises efectuadas. Enquanto que o teste de F nos fornece uma variação significativa e univariada entre amostras relativamente à incerteza obtida na obtenção dos espectros, na análise de PLS os coeficientes b são obtidos de forma a maximizar a covariância entre os números de onda com a percentagem de amilose presente nas amostras.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Nikonenk N., Buslov D., Sushko N., Zhibankov R. *Biopolymers*, **2000**, 57, 257 – 262.
- <sup>2</sup> Kacuraková M., Capek P., Sasinková V., Wellner N., Ebringerová A. *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 43, 195-203

# EFEITO DA ARMAZENAGEM EM REFRIGERADO NOS LÍPIDOS DE PEIXE GATO AFRICANO (*Clarias gariepinus*)

*Bandarra, N.M.<sup>1</sup>, Cordeiro, A.R.<sup>1</sup>, Andrade, A.M.<sup>1</sup>, Mierke-Klemeyer, S.<sup>2</sup>, Oehlenschlager, J.<sup>2</sup>, Nunes, M.L.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca INIAP/IPIMAR, Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal. Tel.: +351-21-3027000; fax: +351-21-3015948. E-mail: narcisa@ipimar.pt

<sup>2</sup> Federal Research Centre for Nutrition and Food, Research Department of Fish Quality, Palmaille 9, 22767 Hamburg, Germany

## Objectivo

Avaliar a estabilidade de ácidos gordos polinsaturados do tipo  $\omega 3$  durante a armazenagem em refrigerado de peixe gato, suplementado com alho enriquecido em alquil-selenocisteínas.

## **Métodos**

Peixe gato Africano foi produzido durante 6 semanas no Instituto RIVO localizado na Holanda. Cerca de 20 indivíduos por tanque foram alimentados com uma dieta comercial suplementada com 70 mg de Selénio/kg ração. A análise do nível de selénio foi realizada por espectrometria de absorção atómica e o perfil de ácidos gordos foi determinado por cromatografia em fase gasosa com um detector de ionização de chama. A identificação dos ésters metílicos de ácidos gordos foi feita por comparação com os tempos de retenção de padrões cromatográficos. Os dados foram analisados com o software Statistica 6.0, por análise paramétrica ( $p < 0,05$ ). As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) e com o teste de Tukey.

## **Resumo de Resultados**

No final do ensaio o nível de selénio nos filetes de peixe gato foi de 0.88-0.97 mg Se/kg. O teor em ácidos gordos do tipo omega-3 variou entre 414-470 mg/100g de filete. Durante os 21 dias de armazenagem em refrigerado não se verificaram diferenças significativas no teor ácido eicosapentaenóico (EPA) e de ácido docosahexaenóico (DHA) ( $p > 0.05$ ). O índice de polienos também não apresentou diferenças significativas ( $p > 0.05$ ) durante o período de armazenagem em refrigerado de 21 dias.

## **Conclusão**

Estes resultados sugerem que esta espécie apresenta uma elevada estabilidade em refrigerado, um nível significativo de EPA e DHA constituindo um excelente alimento funcional rico em selénio.

## **CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE AQUICULTURA EM EMBALAGEM ACTIVA**

*Gonçalves\*, A. e Mendes, R.*

Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas - INIAP/IPIMAR  
Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (DITVPP)

\*e-mail: amparo@ipimar.pt

Os sistemas de embalagem activa proporcionam diversos benefícios para a qualidade e segurança dos produtos alimentares. Visam principalmente o retardamento das reacções de deterioração e consequente extensão do período de conservação útil. Os diferentes sistemas incluem absorventes de humidade, emissores de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), absorventes de oxigénio (O<sub>2</sub>), agentes anti-microbianos, antioxidantes ou outros agentes, que vão sendo libertados de saquetas, previamente introduzidas na embalagem, ou do próprio material de embalagem (filmes).

Os absorventes de O<sub>2</sub> são compostos químicos que reagem com o O<sub>2</sub>, reduzindo a sua concentração residual até valores inferiores a 0,01 %. Deste modo, possibilitam um controlo eficaz do crescimento bacteriano e dos processos oxidativos que provocam perda do valor nutricional e alterações da cor e sabor dos alimentos. A aplicação de CO<sub>2</sub> nos alimentos, antes da sua embalagem, a pressões iguais ou superiores a 2 bar é também considerada uma técnica de embalagem activa, designada por estabilização do CO<sub>2</sub> solubilizado (sigla inglesa SGS – soluble gas stabilisation). Ambas as técnicas exigem a utilização de filmes de embalagem impermeáveis ao O<sub>2</sub>.

No DITVPP têm sido realizados alguns estudos sobre a utilização de embalagem activa na conservação em refrigerado de dourada e robalo, prontos a cozinhar. Os resultados obtidos indicam que a embalagem contendo absorventes de O<sub>2</sub> pode contribuir para uma extensão do período de conservação útil de dourada escamada e eviscerada. A aplicação da técnica de SGS, em combinação com a embalagem sob vácuo, revelou-se eficaz na garantia da qualidade de filetes de robalo, apesar de não ter prolongado o seu período de conservação útil.

### **Agradecimentos**

Os trabalhos referidos foram realizados no âmbito do projecto UE-QCA III-MARE/FEDER: “Qualidade e Inovação dos Produtos da Pesca”.

# EFEITO DE TRATAMENTOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DE PRESSÃO E TEMPERATURA NO ABROLHAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATA (*Solanum tuberosum*)

Rodrigues, I.\*; Saraiva, J.\*\*

\*Departamento Ciência e Tecnologia Alimentar, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-311 Coimbra, Portugal

Tel + 351-239 802 940 Fax +351-239 802 979 e-mail: [ivorod@esac.pt](mailto:ivorod@esac.pt)

\*\*Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Tel + 351-351-234 370 716 Fax 351-234 370 084 e-mail: [jsaraiva@dq.ua.pt](mailto:jsaraiva@dq.ua.pt)

**Palavras-chave:** tubérculos de batata, *Solanum tuberosum*, alta pressão, temperatura, abrolhamento, conservação

**Resumo:** A inibição do abrolhamento de tubérculos de batata é um processo determinante para a qualidade destes tubérculos, sendo hoje realizada, normalmente, utilizando inibidores químicos e baixas temperaturas. Devido a questões ambientais e à crescente procura pelos consumidores de alimentos livres de aditivos ou outros produtos químicos, é previsível que a utilização de inibidores químicos do abrolhamento se torne, por um lado mais restrita, e por outro menos desejável. Deste modo, é importante o estudo de outros métodos, mais “naturais”, de inibição do abrolhamento.

Nos últimos anos a aplicação de alta pressão tem sido cada vez mais estudada para conservação e modificação de alimentos, tendo também revelado a possibilidade de alterar o metabolismo e fisiologia de microrganismos e tecidos vegetais.

Este trabalho teve como objectivo estudar o efeito de tratamentos físicos de pressão e de temperatura, aplicados individualmente e em combinação, no abrolhamento de tubérculos de batata.

## 1. INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) e seus derivados são dos produtos de origem vegetal mais consumidos em todo o mundo. Não sendo possível ter disponíveis durante todo o ano batatas “frescas” para consumo e para processamento industrial, é absolutamente necessário proceder ao seu armazenamento durante longos períodos de tempo. Durante esse período, o metabolismo dos tubérculos continua activo e ocorre, conseqüentemente, o abrolhamento após um período de dormência, de duração variável. O abrolhamento da batata conduz, inevitavelmente, à perda de peso e firmeza dos tubérculos assim como à perda de qualidade sensorial e nutritiva, com a conseqüente perda de valor comercial. Torna-se, então imperativo aumentar o período de dormência dos tubérculos de batata, sabendo-se que se inicia com o começo da tuberização e termina com o recomeço do crescimento activo dos brotos sob condições favoráveis [1].

A nível industrial o abrolhamento da batata é controlado usando temperaturas menores que 10°C e métodos químicos [2]. Dado que os consumidores são cada vez mais sensíveis à utilização de produtos químicos nos produtos que consomem, existe um elevado interesse na substituição dos métodos químicos por métodos físicos, mais “naturais”, que sejam eficazes no aumento do período de dormência e que retardem o início do abrolhamento.

Nos últimos anos, a aplicação de alta pressão (AP) tem sido cada vez mais estudada para conservação e modificação de alimentos [3]. Esta tecnologia, é actualmente utilizada para pasteurizar alimentos a frio e para a inactivação de enzimas [3-5] e para modificação de algumas propriedades funcionais dos alimentos (melhoria da textura e gelificação, p. ex.) [3].

Tratamentos por AP revelaram também a possibilidade de alterar o metabolismo e fisiologia de microrganismos e tecidos vegetais, retardando, por exemplo, a germinação de sementes de ervilhas [6]. Estes resultados apontam para a possibilidade de tratamentos de AP poderem ser usados para controlar o processo de abrolhamento de tubérculos de batata.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras de Batata, tratamentos e condições de abrolhamento**

Neste estudo foram utilizados tubérculos de batata da cultivar “Desireé”, colhidos entre Julho e Setembro dos anos de 2003 e 2004 de tamanho idêntico ( $26,4 \pm 5,7$  g). Amostras de 6 tubérculos de batata, foram colocadas em sacos de plástico, que foram selados a quente, tendo-se previamente retirado o ar, com uma máquina de vácuo. Os tubérculos foram submetidos aos tratamentos de pressão numa prensa isostática (*Autoclave Engineers, Inc.*, EUA). Para os tratamentos térmicos, conjuntos de 6 tubérculos foram embalados do mesmo modo que para os tratamentos de pressão. Os tratamentos térmicos foram efectuados num banho termostatizado (*Selecta, Tectron Bio 3773100*, Espanha).

Os tubérculos, após os tratamentos, foram colocados a abrolhar, acompanhados do respectivo controlo, constituído também por 6 tubérculos, em condições de temperatura ambiente, com luz natural, mas ao abrigo da incidência directa dos raios solares. Os tubérculos foram deixados a abrolhar durante 43 dias. A evolução do abrolhamento foi quantificada pelo registo periódico do número de batatas abrolhadas, número de brotos por batata e comprimento total dos brotos (considerando-se apenas os brotos com comprimento igual ou superior a 3 mm). No final de cada período de abrolhamento foi ainda registada a massa total dos brotos e calculado o rácio comprimento/massa total de brotos. Deste modo, pretendeu-se avaliar o efeito dos tratamentos na inibição do abrolhamento, pelo número de batatas abrolhadas e número de brotos por batata, enquanto que com o comprimento e massa dos brotos e o rácio entre estes dois parâmetros pretendeu-se avaliar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento dos brotos.

### **Determinação das Constantes Cinéticas**

Verificou-se que o comprimento dos brotos ao longo do tempo apresentava, após uma fase inicial, uma evolução linear, seguindo assim uma cinética de ordem zero. As constantes cinéticas,  $k$ , foram estimadas por regressão linear, usando o software Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Seattle, EUA).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Efeito de Tratamentos de Pressão**

Em todos os tratamentos de AP a 1000 (5 e 10 min) e 500 atm (5+5 e 10 min), não se registou abrolhamento até ao fim do ensaio (43 dias), concluindo-se assim que os tratamentos aplicados inibem efectivamente o abrolhamento dos tubérculos. No caso do tratamento P300(5+5) observou-se abrolhamento, mas mais tarde e de modo mais lento. Verifica-se, pela análise da Figura 1(a) que o controlo apresenta a totalidade das batatas abrolhadas a partir do 11º dia enquanto que o tratamento P300(5+5) atinge os 50% de abrolhamento apenas aos 22 dias, verificando-se assim um retardamento do início do abrolhamento causado pelo tratamento P300(5+5). No final do ensaio, verifica-se que os tubérculos do controlo apresentam cerca de um broto a mais por batata abrolhada que os tubérculos submetidos ao tratamento P300(5+5) (Tabela 1). Isto significa que mesmo as batatas que conseguem abrolhar, depois de submetidas ao tratamento P300(5+5), o fazem com maior dificuldade. O comprimento total dos brotos, segue idêntica tendência, com os tubérculos da amostra controlo a apresentarem, no fim do estudo, um comprimento total dos brotos cerca de 2,5

vezes superior ao dos tubérculos tratados por AP (Tabela 1). A constante cinética é maior (cerca do dobro,  $p < 0,05$ ) no controlo.

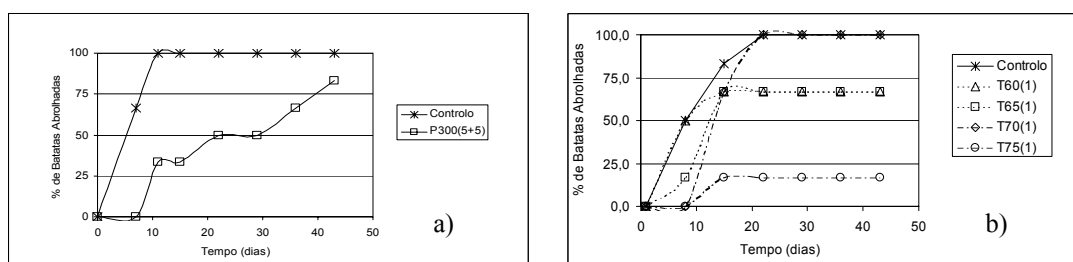


Figura 1 - Percentagem de batatas abrolhadas nos tratamentos de pressão (a) e térmicos (b)

No final do estudo, a massa de brotos é superior em cerca de 10 vezes no controlo (Tabela 1), indicando que embora ocorra a formação de brotos nas batatas tratadas a P300(5+5), estes apresentam uma massa muito menor. A relação entre o comprimento total dos brotos e a sua massa é maior nas batatas tratadas a P300(5+5) em cerca de 5 vezes. Deste modo, os brotos dos tubérculos tratados a P300(5+5) são mais longos e mais finos, enquanto os dos tubérculos controlo são mais grossos e curtos.

### Efeito de Tratamentos Térmicos

No final dos 43 dias de armazenamento nenhum dos tubérculos submetidos aos tratamentos de 3 e 5 minutos, para as temperaturas de 60, 65, 70 e 75°C, apresentava brotos, verificando-se que estes tratamentos são efectivos em inibir o abrolhamento. Assim, só se verificou a

Tabela 1 – Parâmetros de avaliação do abrolhamento ao fim de 43 dias de armazenamento

|                                   | Controlo | P300(5+5) |
|-----------------------------------|----------|-----------|
| % de batatas abrolhadas           | 100      | 83,3      |
| Nº de brotos por batata abrolhada | 4,3      | 3,6       |
| Comprimento total de brotos (mm)  | 267,5    | 120,6     |
| Massa total de brotos (g)         | 4,77     | 0,45      |
| Comprimento / massa brotos (mm/g) | 56,1     | 268,0     |
| $k$ (mim/dia)*                    | 6,29     | 3,65      |

ocorrência de abrolhamento para o tratamento térmico de menor duração (1 min) para as 4 temperaturas estudadas, embora com evidente retardamento do abrolhamento, particularmente relevante para 75°C (Figura 1(b)). Resultados semelhantes verificam-se para o número de brotos por batata abrolhada. O controlo apresenta maior comprimento de brotos (Tabela 2) e constantes cinéticas também superiores (Tabela 2,  $p < 0,05$ ). A massa de brotos é maior e semelhante no controlo e no tratamento T70(1), sendo bastante menor (cerca de um décimo) para o tratamento T75(1) (Tabela 2). A relação comprimento/massa de brotos apresenta um valor menor para os tubérculos submetidos aos tratamentos, particularmente para o caso do tratamento T75(1).

### Tratamentos combinados de pressão seguida de temperatura

Verificou-se que tratamentos combinados resultavam, geralmente, em menor percentagem de batatas abrolhadas e menor número de brotos por batata, que o controlo e os respectivos tratamentos *per si* (aplicados individualmente). Este efeito é mais relevante para os tratamentos combinados P300(10)/T60(1) e P300(10)/T65(1). Resultados semelhantes foram obtidos, para as constantes cinéticas, que nos tubérculos submetidos a estes tratamentos, apresentaram valores menores (cerca de  $\frac{1}{2}$ ) que o controlo e que os tratamentos aplicados individualmente e para a massa total de brotos. Verificou-se uma razão comprimento/massa

de brotos maior para os tratamentos que evidenciam maior capacidade de inibir o abrolhamento, apresentando brotos relativamente mais longos e finos, sendo o controle e o tratamento T60(1) os que apresentam esta razão mais baixa, evidenciando brotos relativamente mais curtos e grossos.

Tabela 2 - Parâmetros de avaliação do abrolhamento ao fim de 43 dias de abrolhamento

|                                    |       | Controlo          | T60(1)            | T65(1)            | T70(1)            | T75(1)            |
|------------------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| % de batatas abrolhadas            |       | 100               | 66,7              | 66,7              | 100               | 16,7              |
| Nº de brotos por batata abrolhada  |       | 2,7               | 2,3               | 2,0               | 2,3               | 1                 |
| Massa de brotos (g)                | Total | 4,25              | 1,97              | 3,2               | 4,17              | 0,46              |
|                                    | Média | 0,71              | 0,66              | 1,07              | 0,7               |                   |
| Comprimento dos brotos (mm)        | Total | 190,3             | 108,0             | 94,6              | 169,6             | 10,0              |
|                                    | Média | 31,7              | 36                | 31,5              | 28,3              |                   |
| Comprimento/massa de brotos (mm/g) | Média | 79,0              | 54,0              | 36,5              | 55,3              | 21,7              |
| <i>k</i> (mim/dia)*                |       | 6,33 <sup>a</sup> | 1,72 <sup>b</sup> | 1,91 <sup>b</sup> | 3,15 <sup>c</sup> | 0,11 <sup>d</sup> |

\* Letras diferentes indicam valores diferentes (teste *t* de student,  $p < 0,05$ )

Globalmente, pode-se concluir que o efeito combinado de pressão seguida de temperatura, inibe o abrolhamento mais eficientemente que os respectivos tratamentos isolados de pressão ou temperatura.

#### 4. CONCLUSÕES

Tratamentos de pressão de 1000 (5 e 10 min) e 500 atm (5+5 e 10 min) inibem o abrolhamento de tubérculos de batatas durante 43 dias, enquanto que tratamentos de 300 atm (5+5 min) retardam o abrolhamento. Tratamentos térmicos de 60°C a 75°C de curta duração (3 e 5 minutos), inibem também o abrolhamento durante pelo menos 43 dias e quando aplicados durante 1 minuto, retardaram o abrolhamento.

Tratamentos combinados de pressão e temperatura, aplicados sequencialmente, causaram uma inibição do abrolhamento superior aos mesmos tratamentos aplicados individualmente.

O efeito inibidor no abrolhamento de tubérculos de batata, causado por tratamentos térmicos de curta duração, tratamentos de pressão e tratamentos combinados de pressão e temperatura, poderá ser de interesse e potencial, para aplicação a nível industrial. O efeito inibidor/retardador do abrolhamento evidenciado pelos tratamentos de pressão poderá ser de muito interesse a nível fundamental, para estudar os mecanismos e causas da quebra de dormência e início do abrolhamento, dado que estes não estão ainda totalmente esclarecidos.

#### Referências

- [1] - Hajirezaei, M. & Sonnewald, U. - *Potato Research*, **42** (1999) 353-372.
- [2] - Jadhav, S. J. & Kadam, S.S. - *Potato*, In D. K Salunkhe & S. Kadam, (eds), *Handbook of Vegetable Science and Technology - Production, Composition, Storage and Processing* (pp. 11-69). Marcel Dekker, Inc, New York (1998).
- [3] - Torres, J. A. & Velazquez, G. - *Journal of Food Engineering*, **67** (2005) 95-112.
- [4] - Castro, S. M., Loey, A. V., Saraiva, J. A., Smout, C. & Hendrickx, M. - *Journal of Food Engineering*, **75** (2006) 50-58.
- [5] - Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I. & Weemaes, C. - *Trends in Food & Technology*, **9** (1998) 197-203.
- [6] - Saraiva, J., Carvalho A. & Machado F. - *Effect of a 50 MPa pressure treatment on green pea seeds germination*. Comunicação em painel no XLII European High Pressure Research Group Meeting, Lausanne (2004).



# EFEITO DO GRAU DE TORRA NAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS MELANOIDINAS DAS INFUSÕES DE CAFÉ

*Nunes<sup>1(\*)</sup>, F.M.; Silvestre<sup>2</sup>, A.J.D.; Coimbra<sup>2</sup>, M.A.*

<sup>1</sup> – Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000 Vila Real, Tel:259350242; e-mail: fnunes@utad.pt

<sup>2</sup> – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3800 Aveiro Tel: 234370706; e-mail: mac@dq.ua.pt

**Palavras-chave:** Infusões de Café; Torra; Melanoidinas; Reacções de Maillard; Polissacarídeos

**Resumo:** Foi desenvolvido um método de fraccionamento e purificação das melanoidinas das infusões de café torrado. Este método envolveu a precipitação em soluções crescentes de etanol, cromatografia de troca aniónica e cromatografia de afinidade de íões cobre (II). Foram isoladas e purificadas seis populações de melanoidinas para as infusões de café com três diferentes graus de torra (suave, média e forte). Estas seis populações de melanoidinas apresentaram diferentes propriedades físico-químicas (solubilidade em etanol e capacidade quelante) e composição de açúcares e proteínas. As fracções isoladas a partir dos três graus de torra apresentaram uma composição similar. Estas fracções de melanoidinas contabilizaram 30 a 33% do material de alto peso molecular solúvel em água fria para os diferentes graus de torra. A análise estrutural permitiu verificar que 16-20% das galactomananas solúveis em água fria, 30-42% das arabinogalactanas e 32-42% do material proteico encontram-se associados a estas populações de melanoidinas. A natureza e abundância dos diferentes polissacarídeos em cada fracção foi dependente da sua solubilidade em etanol. As populações de melanoidinas insolúveis em soluções a 50% de etanol continham maioritariamente galactomananas e as fracções insolúveis em soluções a 75% de etanol continham maioritariamente arabinogalactanas. As populações de melanoidinas com propriedades quelantes continham um conteúdo de açúcares significativamente inferior relativamente às fracções não quelantes, e as fracções solúveis em soluções a 75% de etanol continham apenas quantidades vestigiais de açúcares. A quantidade de compostos resultantes das reacções de Maillard com propriedades quelantes e de compostos fenólicos presentes nas diferentes populações de melanoidinas não permite explicar as diferentes propriedades quelantes das populações de melanoidinas. A presença de uma maior quantidade de açúcares nas populações não quelantes sugere que um diferente arranjo espacial/estrutural dos açúcares nestas populações de melanoidinas modulam a actividade quelante destas melanoidinas.

## 1. INTRODUÇÃO

As melanoidinas são definidas como material macromolecular heterogéneo de cor castanha contendo azoto, resultante da submissão dos alimentos a temperaturas elevadas<sup>1</sup>. As suas características estruturais permanecem desconhecidas, mesmo para os sistemas modelo mais simples de açúcares+aminoácidos.

As infusões de café torrado são uma das principais fontes de melanoidinas na nutrição humana, podendo atingir cerca de 25% dos sólidos totais<sup>2</sup>. As melanoidinas presentes nos alimentos podem apresentar actividades nutricionais interessantes, no entanto têm também sido associados vários riscos ao seu consumo<sup>3</sup>. Por estas razões, o interesse na sua caracterização química e nutricional tem aumentado nos últimos anos.

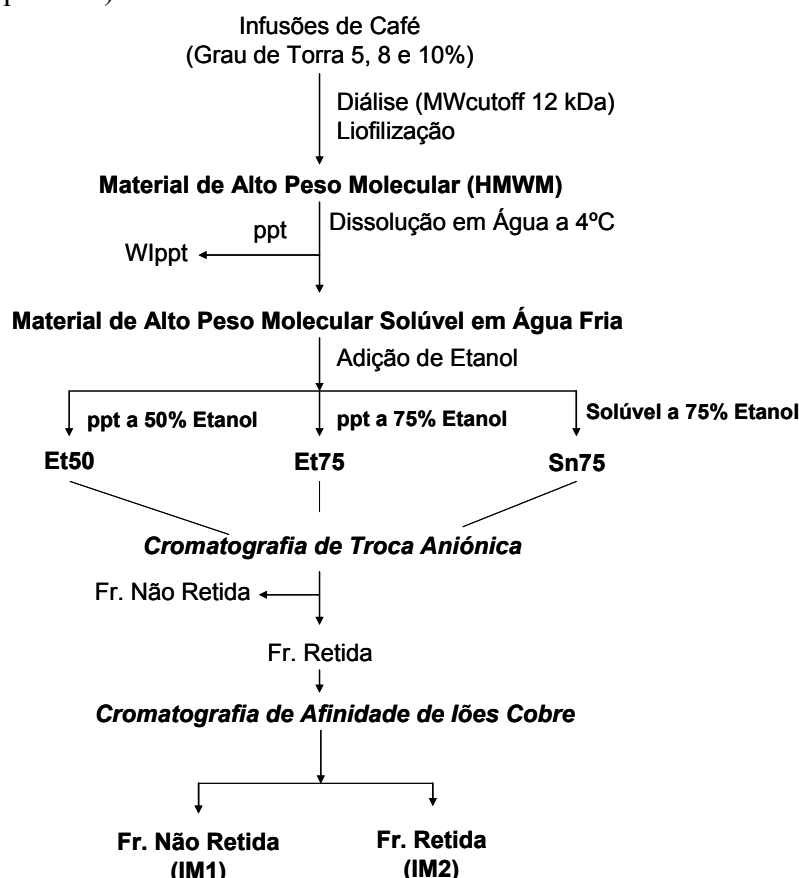
A diversidade de componentes químicos presentes no café verde que podem estar envolvidos na formação de melanoidinas durante o processo de torra, tais como a sacarose, os polissacarídeos, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos clorogénicos, podem aumentar ainda mais a complexidade e heterogeneidade química das melanoidinas presentes neste alimento.

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método eficiente de separação e fraccionamento das melanoidinas das infusões de café submetido a diferentes graus de torra

e a sua caracterização química no que diz respeito ao conteúdo e natureza de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos associados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As infusões de café foram preparadas a partir duma variedade de café arábica (Brasil) com três diferentes graus de torra, uma torra suave correspondendo uma perda de 5% de peso seco relativamente ao peso seco do café verde, uma torra média com uma perda de peso de 8% e uma torra forte correspondente a uma perda de peso de 10%. O procedimento de obtenção das populações de melanoidinas das infusões de café torrado encontram-se a seguir esquematizado (Esquema 1)



**Esquema 1** – Esquema de fracionamento das infusões de café para obtenção das populações de melanoidinas.

A quantidade de açúcares (GC após hidrólise com 1M de ácido sulfúrico e transformação em acetatos de alditol) e a análise estrutural (análise de metilação) foram realizadas por técnicas estabelecidas<sup>4,5</sup>. O conteúdo de ácidos urónicos foi determinado colorimetricamente pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen<sup>6</sup>. O conteúdo de proteína foi determinado por GC após hidrólise com 6M HCl e esterificação com isobutanol e acilação com anidrido heptafluorobutírico<sup>7</sup>. O conteúdo de compostos fenólicos condensados foi realizado por fusão alcalina<sup>8</sup> e determinação dos resíduos fenólicos por GC-MS após sililação<sup>9</sup>. A quantificação de furosina, *N*- $\epsilon$ -carboximetil-lisina (CML) e *N*- $\epsilon$ -carboxietil-lisina (CEL) foram realizadas por GC-MS após hidrólise ácida (7,8 M HCl, 24 h durante 110°C, sob azoto) após esterificação com isobutanol e acilação com anidrido heptafluorobutírico<sup>10</sup>. A potência de cor das populações de melanoidinas foi determinada por análise de diluição de cor<sup>11</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de fraccionamento desenvolvido neste trabalho permitiu obter seis populações de melanoidinas, Et50IM1, Et50IM2, Et75IM1, Et75IM2, Sn75IM1 e Sn75IM2 a partir das três infusões de café torrado com diferentes graus de torra (Tabela 1), propriedades físico-químicas (solubilidade em etanol e capacidade quelante de íons cobre), composição e natureza química em açúcares e material proteico. Estas fracções de melanoidinas contabilizaram 30-33% do HMWM solúvel em água fria para os diferentes graus de torra, tendo metade deste material apresentado capacidade quelante para os íons cobre imobilizados. A análise estrutural permitiu verificar que 16-20% das galactomananas solúveis em água fria, 30-42% das arabinogalactanas e 32-42% do material proteico se encontram associados a estas populações de melanoidinas.

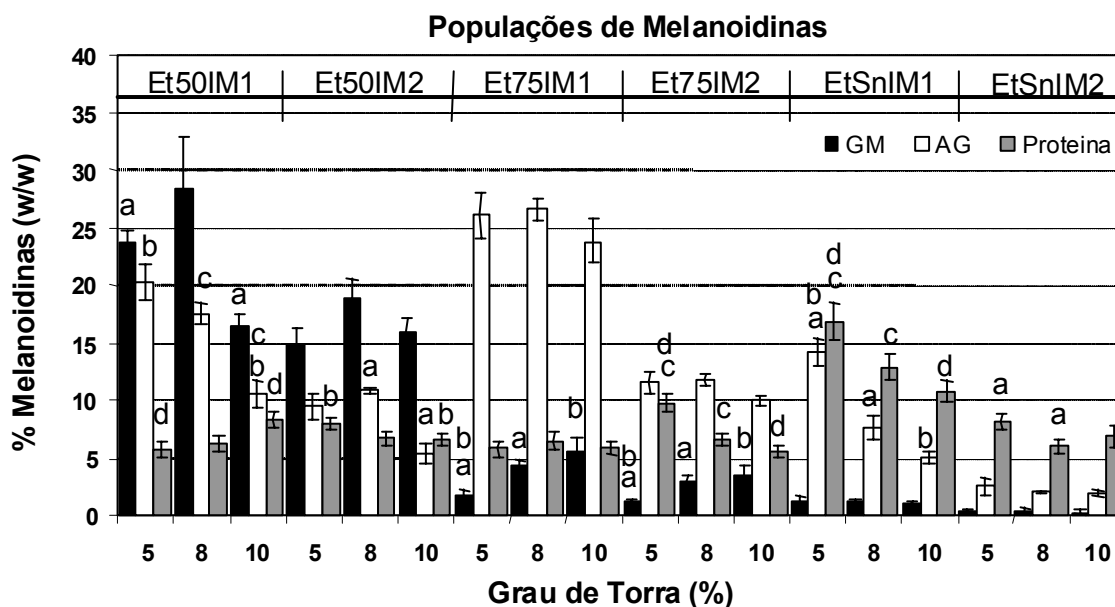
**Tabela 1** – Rendimento, composição em açúcares e aminoácidos das populações de melanoidinas obtidas por fraccionamento do HMWM das infusões de café torrado.

| Fracção | Rendimento <sup>a</sup> | Açúcares <sup>b</sup> | Proteínas <sup>c</sup> |
|---------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| DR5     |                         |                       |                        |
| Et50IM1 | 3,6                     | 51,3 (3,7)            | 5,71 (0,41)            |
| Et50IM2 | 3,3                     | 27,6 (2,4)            | 8,03 (0,29)            |
| Et75IM1 | 4,3                     | 37,4 (2,3)            | 5,82 (0,47)            |
| Et75IM2 | 2,7                     | 14,8 (1,5)            | 9,75 (0,52)            |
| Sn75IM1 | 4,9                     | 20,3 (1,2)            | 16,8 (1,1)             |
| Sn75IM1 | 6,1                     | 3,87 (0,52)           | 8,15 (0,42)            |
| DR8     |                         |                       |                        |
| Et50IM1 | 3,1                     | 49,8 (1,2)            | 6,23 (0,40)            |
| Et50IM2 | 3,3                     | 31,2 (1,7)            | 6,72 (0,37)            |
| Et75IM1 | 5,1                     | 34,2 (1,6)            | 6,48 (0,53)            |
| Et75IM2 | 2,8                     | 16,9 (1,0)            | 6,63 (0,36)            |
| Sn75IM1 | 4,2                     | 10,9 (1,3)            | 12,9 (0,72)            |
| Sn75IM1 | 5,3                     | 2,68 (0,33)           | 6,07 (0,36)            |
| DR10    |                         |                       |                        |
| Et50IM1 | 3,9                     | 30,1 (2,0)            | 8,31 (0,41)            |
| Et50IM2 | 5,3                     | 22,6 (0,7)            | 6,65 (0,32)            |
| Et75IM1 | 3,5                     | 30,7 (0,8)            | 5,83 (0,40)            |
| Et75IM2 | 3,9                     | 14,0 (0,7)            | 5,76 (0,39)            |
| Sn75IM1 | 5,4                     | 8,17 (0,62)           | 10,7 (0,6)             |
| Sn75IM1 | 2,7                     | 3,77 (0,75)           | 6,97 (0,61)            |

<sup>a</sup> percentagem peso/peso relativamente ao HMWM; <sup>b</sup> percentagem de resíduo de açúcares nas fracções; <sup>c</sup> percentagem de resíduos de aminoácidos nas fracções. Os valores entre parêntesis são os respectivos desvios padrão (n=3).

A quantidade de açúcares recuperados nas populações Et50IM1, Et50IM2, Et75IM1, Et75IM2 e Sn75IM1 (Figura 1), que apresentaram características estruturais similares aos polissacarídeos isolados a partir das infusões<sup>4</sup> e paredes celulares<sup>12</sup> de café verde, permitem inferir que uma parte significativa das melanoidinas das infusões de café tem a sua origem nas paredes celulares dos grãos de café. Isto não exclui que outros componentes dos grãos de café também possam intervir na formação destas melanoidinas, já que durante a torra ocorre um colapso das células<sup>13</sup> ocorrendo provavelmente um contacto entre eles. As diferentes proporções de galactomananas (GM) e arabinogalactanas (AG) nas populações de melanoidinas recuperadas a partir das fracções Et50, Et75 e Sn75 podem representar

diferentes localizações dentro do próprio grão de café dada a heterogeneidade das suas paredes celulares<sup>14</sup>.



**Figura 1** – Conteúdo de açúcares tipo galactomanana (GM), arabinogalactanas (AG) e proteína das populações de melanoidinas purificadas a partir do HMWM das infusões de café torrado com diferentes graus de torra. As mesmas letras em cada fração de melanoidina representam diferenças significativas ( $p=0,05$ )

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Ledl F., Scheicher E. *Angew. Chem. - Int. Ed. English*, **1990**, 29, 565-594.
- <sup>2</sup> Borrelli, R. C.; Visconti, A.; Mennella, C.; Anese, M.; Fogliano, V. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6527-6533.
- <sup>3</sup> Somoza V. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 663-672.
- <sup>4</sup> Nunes, F. M.; Coimbra, M. A. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1773-1782.
- <sup>5</sup> Nunes, F. M.; Coimbra M. A. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1429-1434.
- <sup>6</sup> Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. *Anal. Biochem.* **1973**, 54, 484-489
- <sup>7</sup> MacKenzie, S. L. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, 70, 151-160
- <sup>8</sup> Batistic, L. O.; Mayaudon, J. *Plant Soil*, **1970**, 33, 473-477.
- <sup>9</sup> Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Karumanchiri, A.; Goldberg, D. M. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4405-4409.
- <sup>10</sup> Knecht, K. J.; Dunn, J. A.; McFarland, K. F.; McCance, D. R.; Lyons, T. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. *Diabetes*, **1991**, 40, 190-196.
- <sup>11</sup> Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3912-3917
- <sup>12</sup> Fischer, M.; Reimann, S.; Trovato, V.; Redgwell, R. J. *Carbohydr. Res.*, **2001**, 330, 93-101.
- <sup>13</sup> Illy A., Viani R. *Espresso Coffee. The chemistry of Quality*; Academic Press: London, 1995, Chapter 5
- <sup>14</sup> Sutherland, P. W.; Hallett, I. C.; MacRae, E.; Fischer, M.; Redgwell, R. J. *Protoplasma*, **2004**, 223, 203-211.

# ENVELHECIMENTO DE SUMOS DE CITRINOS EM DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGEM

Feliciano, R. <sup>\*1,2</sup>, Antunes, C. <sup>2,4</sup>, Mendes, P. <sup>1</sup>, Bronze, M.R. <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901. Oeiras, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras, Portugal

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

Tel: +351-214469772, Fax: +351-214417062 email:rodrigof@itqb.unl.pt

**Palavras-chave:** envelhecimento, sumos, laranja, limão, embalagem

## Resumo:

Os tratamentos utilizados a nível industrial permitem aumentar a estabilidade de um produto durante o seu prazo de validade mas alguns deles, nomeadamente os tratamentos que envolvem temperaturas elevadas, podem causar no alimento alterações químicas que podem afectar a qualidade do produto final. Neste trabalho foram efectuados ensaios de envelhecimento acelerado no qual amostras comerciais de sumo de laranja e limão em embalagem de vidro e Tetrapack foram colocadas a 40°C durante 21 dias. A amostragem foi efectuada aos 0, 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias e os compostos voláteis nas amostras foram analisados por cromatografia gasosa (GC) associada a espectrometria de massa (MS) com preparação por microextração em fase sólida (SPME) e os compostos fenólicos foram analisados por cromatografia líquida (HPLC), associada a diferentes modos de detecção, fluorescência (FD), electroquímica (ED) e UV-vis (DAD). Os resultados mostram que existem diferenças importantes a nível dos compostos furânicos ao longo das amostras analisadas e correspondentes aos diferentes períodos de tempo. Foi observado que muitos dos compostos voláteis, responsáveis pelo aroma característico do sumo de laranja, sofreram alterações importantes durante o processo de envelhecimento dos sumos, nomeadamente, o  $\beta$ -pineno, o  $\alpha$ -pineno, o octanal, o limoneno, o linalol, entre outros. Verificou-se também a formação de  $\alpha$ -terpineol (e de  $\beta$ -terpineol), que é um dos principais responsáveis pela alteração das características do aroma de laranja, sendo por isso considerado um *off-flavour* dos sumos de citrinos.

Um painel de consumidores efectuou provas discriminativas, provas triangulares, para comparação de amostras de sumo de limão e de laranja ao longo do ensaio de envelhecimento. Para o sumo de laranja foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,1$ ) logo após o dia 1. As alterações na composição química das amostras de sumo de limão parecem não afectar de forma tão pronunciada as características organolépticas dos produtos, ao longo do processo de envelhecimento.

## 1. INTRODUÇÃO

Na dieta humana os sumos de citrinos são uma fonte importante não só de vitamina C como também de compostos fenólicos que, para além de apresentarem propriedades funcionais importantes contribuem também para as suas propriedades sensoriais.

Os sumos de citrinos mais consumidos em Portugal correspondem a preparados obtidos de forma artesanal ou industrial de frutos como o limão e a laranja. Devido ao aroma fresco e agradável que apresentam, os sumos de laranja obtidos artesanalmente são das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Contudo, os sumos processados industrialmente possuem um aroma diferente devido não só à pressão empregue mas também ao tratamento térmico aplicado durante o seu processamento. Enquanto que a maior parte dos frutos deve o seu *flavour* característico aos ésteres alifáticos, o *flavour* dos citrinos depende essencialmente do óleo essencial da pele que apresenta na sua composição química compostos terpénicos como o limoneno, o mirceno, o valenceno e terpenóis lipossolúveis como o linanol, o terpinen-4-ol

e o  $\alpha$ -terpineol localizados nos sacos do exocarpo que migram para o sumo durante a extração [1].

Cerca de 90% do óleo essencial de laranja é constituído pelo monoterpeneo d-limoneno, mas a contribuição mais relevante para o aroma é devida a compostos oxigenados que se encontram em menores concentrações, nomeadamente aldeídos, ésteres e álcoois [2]. Todavia, o limoneno é considerado, por alguns autores, como tendo uma importância residual na percepção do odor [3]. As diferenças na composição química podem ser atribuídas ao tipo de cultivar utilizada como matéria-prima, grau de maturação, condições pedoclimáticas, entre outras. Relativamente ao sumo as suas características vão depender do tipo de processamento a que a fruta é sujeita, nomeadamente do processo de conservação bem como o tipo de embalagem em que as amostras são armazenadas (Tetrapak, vidro, plástico, por exemplo).

Trabalhos já realizados mostram que alguns compostos, nomeadamente o  $\alpha$ -terpineol caracterizado como *off-flavour*, ao formar-se ao longo do armazenamento dos sumos, pode comprometer a sua qualidade sensorial. Para este composto foi já determinado o limiar de detecção olfactivo 330-350 ppb, em água [4].

Este trabalho pretende-se estudar a variação na composição química de sumos de citrinos e relacionar com os resultados da análise sensorial efectuada a amostras sujeitas a ensaios de envelhecimento acelerado em diferentes tipos de embalagens.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

Os sumos pasteurizados comerciais foram fornecidos por uma indústria e colocados numa estufa a 40°C durante 1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias.

### **2.1. Preparação de amostras para análise por GC-MS**

Para a concentração dos compostos foi usada uma fibra de DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu$ m). Foram colocados 7 mL de amostra num vial de 15 mL. A amostra foi aquecida num banho a 37°C foi agitada durante 10 minutos e posteriormente expôs-se a fibra ao espaço de cabeça da amostra durante 10 minutos.

### **2.2. Condições de análise em GC-MS**

Os compostos voláteis foram analisados num cromatógrafo gasoso (GC-2010, *Shimadzu*) acoplado a um espectrómetro de massa (GCMS-QP2010, *Shimadzu*) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (*J&W*). Após concentração da amostra a fibra foi introduzida no injector (250°C) durante 3 minutos em modo split (1:50). O programa de temperatura iniciou-se com uma temperatura inicial de 40°C durante 5 minutos e depois sofreu um incremento de 5°C/min até atingir 170°C, seguido de uma rampa de temperatura de 30°C/min até 230°C, temperatura à qual permaneceu durante 4 minutos. A temperatura da fonte iónica era de 250°C e os espectros de massa obtidos por impacto de electrões (EI) foram adquiridos em full scan no intervalo m/z=30-300 u.m.a.. A identificação dos compostos foi efectuada por comparação do espectro de massa com os espectros nas bibliotecas Wiley 229, NIST 12, 27 e 147.

### **2.3. Preparação de amostras para análise por HPLC**

O sumo foi centrifugado (5000 rpm, 15°C, 5min) e filtrado (0.45 $\mu$ m).

### **2.4. Condições de análise em HPLC**

As amostras foram injectadas num sistema HPLC-DAD *Surveyor (Thermo Finnigan)* e os compostos foram separados numa coluna de fase reversa utilizando um gradiente de eluentes [5]. No detector de fluorescência (SpectraSystem FL3000) utilizou-se um comprimento de onda de excitação de 280 nm e de emissão de 320 nm e o detector electroquímico (DIONEX ED 40) foi programado para uma variação de potencial entre -1,0 mV e +1,0 mV durante 1 s. Para controlar os equipamentos utilizou-se o programa Chromquest 4.1 e para aquisição dos

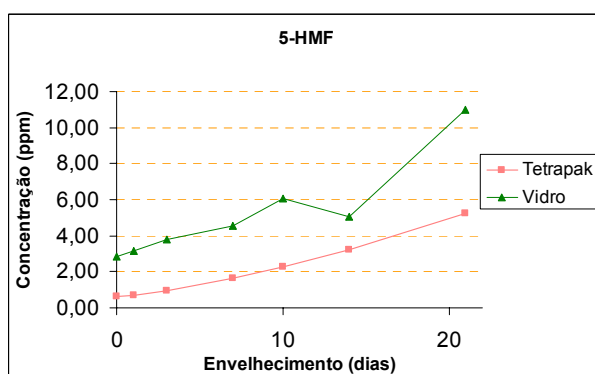
dados utilizou-se na detecção com DAD o programa Chromquest 4.1 e o 4880 quando se utilizou o detector electroquímico e o detector de fluorescência.

### 2.5. Análise sensorial

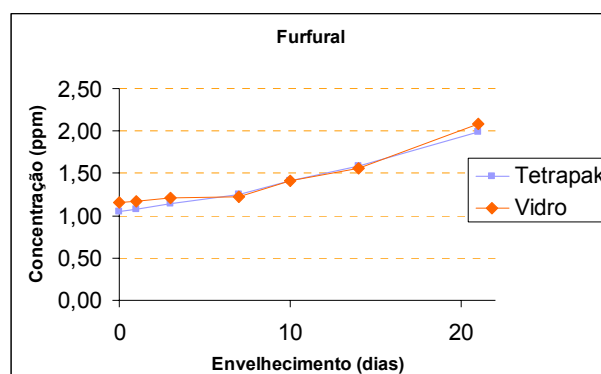
Foram efectuadas provas triangulares (21 e 24 provadores) apenas para embalagem Tetrapak. As amostras envelhecidas foram sempre comparadas com amostras do tempo 0 (não sujeitas a envelhecimento) e foi avaliado o seu cheiro e sabor.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos resultados obtidos para as amostras de sumo de laranja não sujeitas a envelhecimento mostram que os teores de 5-HMF são superiores nas amostras em embalagem de vidro, enquanto que os teores de furfural são semelhantes nos dois tipos de embalagem. O teor de ácido ascórbico não apresenta diferenças importantes entre as amostras nas duas embalagens em estudo. Ao longo do ensaio de envelhecimento verifica-se que alguns compostos alteram os seus teores, sendo as variações mais importantes detectadas para furanos como 5-HMF e furfural que sofrem um aumento considerável ao longo do ensaio de envelhecimento. As alterações dos teores dos furanos podem ser observadas nas figuras 1 e 2.



**Figura 1**-Variação do teor de 5-HMF ao longo do ensaio de envelhecimento de sumos de laranja

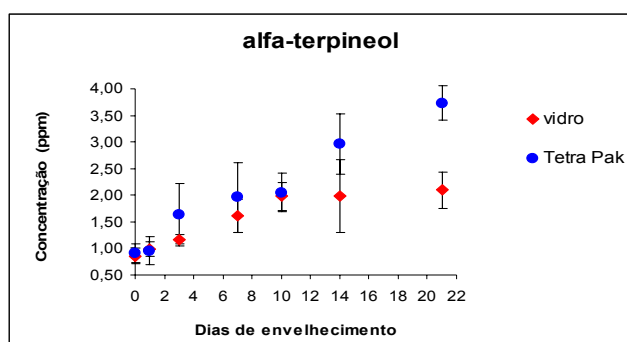


**Figura 2**-Variação do teor de furfural ao longo do ensaio de envelhecimento de sumos de laranja

Relativamente aos compostos voláteis observaram-se alterações importantes nas amostras envelhecidas, nomeadamente no que se refere aos teores de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, octanal, limoneno, linalol. Verificou-se também a formação de  $\alpha$  e  $\beta$ -terpineol. A concentração mínima de  $\alpha$ -terpineol na amostra de sumo de laranja não envelhecido foi de  $0,91 \pm 0,09$   $\mu\text{g/mL}$  e como teor máximo obteve-se  $3,73 \pm 0,21$   $\mu\text{g/mL}$  para a amostra com 21 dias de envelhecimento (embalagem Tetrapack). Enquanto que para a embalagem de vidro o teor aumenta até ao dia 10 e depois estabiliza, na embalagem Tetrapak o seu aumento é progressivo até ao final do ensaio (ver figura 3).

Tal como aconteceu com os sumos de laranja, as diferenças mais importantes nos perfis cromatográficos obtidos na análise por HPLC-DAD dos sumos de limão, localizam-se nos compostos de tempos de retenção menores.

No que se refere aos compostos voláteis verificou-se que o envelhecimento acelerado provocou um aumento do teor em 4'-metilacetofenona, a qual é responsável pelo aroma do sumo de limão oxidado e ocorreu uma diminuição do teor de citral, composto que é o principal responsável pelo odor característico a limão.



**Figura 3-**Variação do teor de  $\alpha$ -terpineol ao longo do ensaio de envelhecimento de sumos de laranja

Ao contrário do que sucede nos sumos de laranja, onde a quantidade de  $\alpha$ -terpineol aumenta durante o processo de envelhecimento dos sumos, nos sumos de limão ocorre a situação contrária, ou seja, a quantidade de  $\alpha$ -terpineol diminui durante o processo de envelhecimento acelerado. Esta diminuição do teor poderá estar relacionada com a conversão deste composto noutros compostos. Em condições ácidas e prolongado armazenamento dos sumos de citrinos, o  $\alpha$ -terpineol pode-se converter noutros compostos como o *cis*- e *trans*-1,8-*p*-mentanodiol.

O teor de ácido ascórbico nos sumos de limão é cerca de metade do valor encontrado para amostras de sumo de laranja. As amostras sujeitas a envelhecimento registam um decréscimo que em ambos os casos ronda os 10%

Os resultados da avaliação sensorial apresentados na tabela 1, mostraram que para o sumo de laranja em embalagem Tetrapack, os provadores detectaram logo diferenças na comparação de amostra não envelhecida e amostra sujeita a 1 dia de envelhecimento.

| Sumo de laranja |    |                     |                                       | Sumo de limão |    |                     |                                       |
|-----------------|----|---------------------|---------------------------------------|---------------|----|---------------------|---------------------------------------|
| Prova           | n  | Respostas correctas | Nível de significância dos resultados | Prova         | n  | Respostas correctas | Nível de significância dos resultados |
| 0 vs 1          | 24 | 12                  | 90 %                                  | 0 vs 1        | 21 | 8                   | -                                     |
| 0 vs 3          | 24 | 13                  | 95%                                   | 0 vs 3        | 24 | 7                   | -                                     |
| 0 vs 7          | 24 | 13                  | 95%                                   | 0 vs 7        | 21 | 7                   | -                                     |
| 0 vs 10         | 24 | 16                  | 99,9%                                 | 0 vs 10       | 24 | 13                  | 95 %                                  |

**Tabela 1-** Resultados obtidos nas provas triangulares realizadas com um painel de consumidores (n), para comparação de sumos com diferentes tempos de envelhecimento, em embalagem Tetrapak

Para o sumo de limão, o painel apenas detectou diferenças após 10 dias de envelhecimento, sugerindo que este tipo de amostra conserva melhor as suas propriedades organolépticas, no que se refere a cheiro e sabor, quando sujeitos a condições de *stress*.

### Referências

- [1] Maccarone, E., *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998), 2293-2298
- [2] Ahmed, E. M. *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1 (1978), 187-191
- [3] TØnder D., *et al*, *Food Chemistry*, 61, 1/2 (1998), 223-229
- [4] <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm> (consultado em 10-04-06)
- [5] Bravo, M.N. *et al*, *Analytica Chimica Acta*, 563,1-2, 23 (2006),84-92



# ESTUDO DO EFEITO DA ADUBAÇÃO AZOTADA, DO TIPO DE ADUBO E DA SUA ÉPOCA DE APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO E NA QUALIDADE TECNOLÓGICA DE UMA VARIEDADE DE TRIGO MOLE

*Parreira, A.; Penacho, J.; Patanita, M.; Ferro Palma, J.; Dores, J.(\*) e Costa, M.*

Escola Superior Agrária de Beja, Centro de Experimentação Agrícola  
Rua de Pedro Soares, 7801-903 Beja  
Tel +351-284 314 300 Fax +351-284 388 207 e-mail: [jdores@esab.ipbeja.pt](mailto:jdores@esab.ipbeja.pt)

**Palavras-chave:** trigo mole, azoto, adubo, época de aplicação, qualidade tecnológica

**Resumo:** No ano agrícola de 2005/2006 foi realizado, pelo Centro de Experimentação Agrícola da Escola Superior Agrária de Beja, em colaboração com as empresas A. Cano e Compo Agricultura, através do seu Departamento de Investigação e Desenvolvimento, um ensaio de campo para avaliar o efeito da aplicação de dois planos de adubação azotada, um utilizando dois adubos convencionais e outro utilizando um adubo da gama ENTEC, comercializado pela Compo Agricultura, que incorpora um inibidor da nitrificação (3,4 dimetilpirazol fosfato - DMPP) sobre o rendimento em semente e sobre a qualidade tecnológica de uma variedade de trigo mole. Foram ainda experimentados, em ambos os planos, dois níveis de aplicação de azoto, um com uma dose normal (100 kg/ha) e outro com uma dose baixa (75 kg/ha), e duas épocas de aplicação (em fundo à sementeira e em cobertura antes do afilhamento). No total foram realizados sete tratamentos distintos, incluindo um tratamento sem fertilização. Os parâmetros de qualidade analisados foram a massa do hectolitro, o Índice de queda, o Índice de Zeleny, a percentagem de glúten, o rendimento em farinha e os resultados do alveograma (P, L, P/L e W). Não se observou nenhum efeito significativo da adubação azotada, tanto sobre o Índice de Zeleny como sobre a massa do hectolitro. Os valores do Índice de Zeleny, entre 22 e 25,5, indicam que estamos perante uma variedade com uma qualidade para panificação apenas aceitável. O valor mais baixo do Índice de Zeleny foi observado no tratamento sem fertilização e o mais alto no tratamento com a aplicação do adubo da gama ENTEC, com o nível de aplicação normal e em adubação de fundo.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos trigos moles para a indústria de panificação depende largamente de algumas das técnicas de cultivo empregues no seu cultivo, destacando-se entre estas a adubação azotada. É bem conhecido o efeito, em geral benéfico, que uma adequada disponibilidade de azoto pode ter sobre o teor de proteína e a qualidade para panificação da farinha de trigo. Embora o efeito da quantidade de azoto posto à disposição da cultura sobre a qualidade para panificação do trigo mole seja importante, importa também considerar o tipo de adubo utilizado e a época da sua aplicação, na medida em que estas decisões irão afectar a prontidão com que o azoto pode ser absorvido pelas plantas e a fase do desenvolvimento do trigo em que a absorção deste nutriente se irá dar com maior intensidade.

Para estudar o efeito da adubação azotada sobre o rendimento em semente e sobre a qualidade tecnológica de uma variedade de trigo mole, o Centro de Experimentação Agrícola da Escola Superior Agrária de Beja, em colaboração com as empresas A. Cano e Compo Agricultura, realizou no ano agrícola de 2005/2006 um ensaio de campo, instalado em Beja, no Centro

Experimental da Escola Superior Agrária. Foram experimentados dois planos de adubação azotada, um utilizando dois adubos convencionais e outro utilizando um adubo da gama ENTEC, comercializado pela Compo Agricultura, que incorpora um inibidor da nitrificação (3,4 dimetilpirazol fosfato - DMPP) sobre o rendimento em semente e sobre a qualidade tecnológica de uma variedade de trigo mole. Foram ainda experimentados, em ambos os planos, dois níveis de aplicação de azoto e duas épocas de aplicação.

O 3,4 dimetilpirazol fosfato (DMPP) é uma molécula desenvolvida pela BASF cuja principal acção consiste na inibição temporal das bactérias *nitrosomonas* do solo. Este efeito permite bloquear durante um período de tempo variável o amoníaco presente no solo, nomeadamente o proveniente da adubação azotada, com consequências a vários níveis: redução muito significativa das perdas de azoto do solo por lixiviação e desnitrificação, com evidentes vantagens ambientais; permite planificar e otimizar uma adubação combinada de azoto amoniacal e azoto nítrico, com benefício para diversos parâmetros produtivos das culturas; aumento da absorção e disponibilidade de fósforo e micronutrientes devido a um maior desenvolvimento das raízes das culturas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de campo foi realizado segundo um dispositivo experimental em blocos casualizados completos com quatro repetições. A variedade de trigo mole experimentada foi a Torero.

Foram experimentados dois planos de adubação azotada, um utilizando dois adubos convencionais e outro utilizando um adubo da gama ENTEC. Foram ainda experimentados, em ambos os planos, dois níveis de aplicação de azoto, um com uma dose normal (100 kg/ha de N) e outro com uma dose baixa (75 kg/ha de N), e duas épocas de aplicação (em fundo à sementeira e em cobertura antes do afilhamento). No total foram realizados sete tratamentos distintos, incluindo um tratamento sem fertilização, como a seguir se descrevem.

### **Tratamento 1 - Sem fertilização**

### **Tratamento 2 - Fertilização convencional em dose normal**

200 kg/ha do adubo 20-20-0 em adubação de fundo e 200 kg/ha de um adubo Nitroamoniacal 26% em adubação de cobertura

### **Tratamento 3 - Fertilização convencional em dose baixa**

175 kg/ha do adubo 20-20-0 em adubação de fundo e 150 kg/ha de um adubo Nitroamoniacal 26% em adubação de cobertura

### **Tratamento 4 - Fertilização ENTEC em fundo e dose normal**

400 kg/ha de um adubo ENTEC 25-15-0 em adubação de fundo

### **Tratamento 5 - Fertilização ENTEC em fundo e dose baixa**

300 kg/ha de um adubo ENTEC 25-15-0 em adubação de fundo

### **Tratamento 6 - Fertilização ENTEC antes do afilhamento e dose normal**

400 kg/ha de um adubo ENTEC 25-15-0 em adubação de cobertura antes do afilhamento

### **Tratamento 7 - Fertilização ENTEC antes do afilhamento e dose baixa**

300 kg/ha de um adubo ENTEC 25-15-0 em adubação de cobertura antes do afilhamento

Depois da colheita da semente, fazendo uso de um divisor-homogeneizador de sementes mecânico, tipo divisor de terras, fez-se a redução da amostra de semente colhida em cada

parcela experimental até à obtenção da amostra de laboratório, com a qual foram realizadas as análises de qualidade tecnológica.

Os parâmetros de qualidade analisados e as normas seguidas foram, a massa do hectolitro (NP - 988:1993), o Índice de queda (NP - 1590:1986), o Índice de Zeleny (NP - 1871:1998), o teor de glúten seco (NP - 2244:1984), o rendimento em farinha e os resultados do alveograma (P, L, P/L e W) (NP - 3181:1986). No momento em que este documento está sendo redigido apenas estão totalmente disponíveis os dados referentes ao Índice de Zeleny e à massa do hectolitro.

Do ponto de vista climático o ano agrícola de 2005/2006 foi bastante favorável pois a distribuição da precipitação durante quase todo o desenvolvimento do trigo foi regular.

Os resultados obtidos no trabalho experimental foram estudados pela análise de variância. O modelo utilizado na análise foi o de blocos completos casualizados monofactorial, tendo a adubação azotada como único factor. Para fazer a separação das médias dos tratamentos utilizou-se o teste de Duncan, executado para um nível de significância de 5%. Por fim, apresentam-se também os valores da diferença mínima significativa (D.M.S.) e do coeficiente de variação (Coef. Var.).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode verificar através da análise de variância (Quadro 1), não se verificou nenhum efeito estatisticamente significativo da adubação azotada sobre o Índice de Zeleny e sobre a massa do hectolitro. Pelo contrário, em relação ao rendimento em semente observaram-se diferenças altamente significativas ( $p \leq 0,001$ ). Verifica-se assim que um efeito significativo da adubação azotada sobre o rendimento em semente não se traduziu num igual efeito sobre a sua qualidade tecnológica.

**Quadro 1** - Tabela da análise de variância para o rendimento em semente, para o Índice de Zeleny e para a Massa do Hectolitro.

| Origem da Variação | GL | Rendimento em semente |           | Índice de Zeleny |           | Massa do Hectolitro |           |
|--------------------|----|-----------------------|-----------|------------------|-----------|---------------------|-----------|
|                    |    | F calc.               | Prob. (%) | F calc.          | Prob. (%) | F calc.             | Prob. (%) |
| Repetição          | 3  | 2,45                  |           | 0,77             | n.s.      | 2,13                | n.s.      |
| Tratamento         | 6  | 59,88                 | ***       | 1,28             | n.s.      | 1,22                | n.s.      |
| Coef. Var. (%)     |    | 5,75                  |           | 7,91             |           | 1,38                |           |

Em relação ao efeito da adubação azotada sobre a qualidade para panificação, verificamos que o Índice de Zeleny variou entre 22 e 25,5 (Quadro 2). São valores que indicam que estamos perante uma variedade com uma qualidade para panificação apenas aceitável [1]. Embora não existam diferenças significativas entre os tratamentos, podemos constatar que o valor mais baixo do Índice de Zeleny foi observado no tratamento sem fertilização, indicador de que a limitação na disponibilidade de azoto provoca uma diminuição na qualidade para panificação das farinhas de trigo. Neste caso a quebra no Índice de Zeleny não foi mais marcada porque o rendimento em semente foi também muito mais baixo e, por isso, a menor quantidade de azoto disponível repartiu-se por um menor número de sementes, limitando a quebra no valor do Índice. Podemos ainda constatar que as diferenças nos valores do Índice de Zeleny entre os dois níveis de adubação (75 e 100 kg/ha), entre os dois planos de adubação (com os adubos convencionais e com o adubo da gama ENTEC) e, na adubação com o adubo ENTEC, entre a adubação de fundo e a adubação de cobertura, foram mínimas. Parece assim evidente que a

aplicação de um adubo com um inibidor da nitrificação incorporado, aplicado numa única adubação, comparado com o esquema tradicional, em que se utilizam adubos nitroamoniacais em duas adubações (de fundo e de cobertura) não leva a uma diminuição da qualidade para panificação do trigo mole. Para o agricultor sobra a vantagem de adubar de uma vez só, diminuindo os gastos da aplicação dos adubos.

A resposta do rendimento em semente à adubação azotada foi bastante mais complexa. O rendimento mais elevado foi obtido no tratamento em que se aplicou o adubo ENTEC na dose normal e em adubação de fundo. Pelo contrário, o rendimento mais baixo, como seria de esperar, foi o do tratamento sem fertilização. O rendimento em semente foi também mais alto com a dose normal de adubo (100 kg/ha) e, no plano de adubação com o adubo ENTEC, na adubação de fundo. Entre os dois planos de adubação (convencional vs. ENTEC) os resultados foram, quase rigorosamente, iguais.

**Quadro 2** - Médias e Teste de Duncan relativos ao rendimento em semente (kg.ha<sup>-1</sup>), ao Índice de Zeleny (mm) e à Massa do Hectolitro (kg/hl) por tratamento.

| Tratamento   | Rendimento em semente |        | Índice de Zeleny |      |        | Massa do Hectolitro |       |        |            |
|--------------|-----------------------|--------|------------------|------|--------|---------------------|-------|--------|------------|
|              | kg.ha <sup>-1</sup>   | Duncan | % da média       | mm   | Duncan | % da média          | kg/hl | Duncan | % da média |
| Tratamento 1 | 2178                  | e      | 55               | 22,0 | a      | 93                  | 79,4  | a      | 101        |
| Tratamento 2 | 4583                  | ab     | 116              | 23,3 | a      | 98                  | 78,6  | a      | 100        |
| Tratamento 3 | 3899                  | cd     | 99               | 23,8 | a      | 100                 | 77,7  | a      | 99         |
| Tratamento 4 | 4902                  | a      | 124              | 25,5 | a      | 108                 | 78,2  | a      | 99         |
| Tratamento 5 | 4224                  | bc     | 107              | 23,3 | a      | 98                  | 79,3  | a      | 101        |
| Tratamento 6 | 4209                  | bc     | 106              | 24,0 | a      | 101                 | 78,8  | a      | 100        |
| Tratamento 7 | 3701                  | d      | 94               | 24,0 | a      | 101                 | 78,8  | a      | 100        |
|              | 3956                  |        |                  | 23,7 |        |                     | 78,7  |        |            |

#### 4. CONCLUSÕES

Apenas com os dados de um ano de ensaio não é possível tirar conclusões definitivas, pois a climatologia de cada ano exercerá, por certo, uma influência muito marcada sobre o rendimento em semente e sobre a sua qualidade tecnológica. Perante os resultados deste ano parece, contudo, bastante evidente que a aplicação de um adubo com um inibidor da nitrificação incorporado, aplicado numa única adubação, comparado com o esquema tradicional, em que se utilizam adubos nitroamoniacais em duas adubações (de fundo e de cobertura) não leva a uma diminuição da qualidade para panificação do trigo mole. Para o agricultor sobra a vantagem de adubar de uma vez só, diminuindo os gastos na aplicação dos adubos. Pode-se também concluir que neste ano a adubação azotada foi mais determinante para o rendimento em semente do que para a sua qualidade tecnológica.

#### Referências

[1] - Lopez Bellido, L. - Cultivos Herbáceos. Vol I - Cereales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (1991).

## EFFECTS OF FOOD COOKING ON HETEROCYCLIC AMINE FORMATION

*Pinho<sup>1,2</sup>, O.; Petisca<sup>1</sup>, C.; Ferreira<sup>2</sup>, I.M.P.L.V.O.*

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>2</sup>REQUIMTE, Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 4050-047 – Porto, Portugal.

The preparation of food consumption, as well as manufacturing of various products involves the application of several discrete unit operations and processes. Processing operations may decrease the natural toxicity of some raw materials by eliminating specific undesirable components. However, in other cases processing reduces the biological value of the products by leaching or destroying essential ingredients, or due to the chemical changes that occur during food processing operations.

Cooking, specially frying or broiling of meat, leads to the formation of compounds with mutagenic activity, such as, heterocyclic amines (HAs). More than 20 mutagenic/carcinogenic HAs have been identified in cooked foods. Their formation is the result of complex reactions that involve creatine, free amino acids and carbohydrates through the Maillard Reaction (MR). The development of MR also occurs through a free radical mechanism which has been shown to play an important role in the formation of imidazoquinoxalines and imidazoquinolines.

The presence of HAs in foods depend on many factors such as cooking method, time and temperature, the presence of relative amounts of precursors, enhancers and inhibitors, lipids, antioxidants and water content. HAs are primarily found in the crust of grilled or fried meat and fish, and to a much less extent in the interior of cooked meat. Various antioxidants are able to inhibit HAs formation in chemical model systems and often to reduce the HA-induced mutagenicity/carcinogenicity in vitro and in vivo biological systems.

HPLC in combination with photodiode array UV and fluorescence detectors was used for identification and quantification of quinolines (IQ, MeIQ), quinoxalines (IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx) pyridines (PhIP) pyridoimidazoles and indoles (Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC). Contents of those compounds in meat processed foods prepared by different cooking process were evaluated.



# EVOLUÇÃO DA COR EM VINHOS TINTOS CONSERVADOS EM CONTACTO COM APARAS DE MADEIRA DE CARVALHO DE DUAS ESPÉCIES (*Q. pyrenaica* Willd. e *Q. petraea* Liebl.): COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR VIA INSTRUMENTAL E SENSORIAL

Jordão, A.M.\* e Gomes, C.J.

Departamento das Industrias Agro-Alimentares, Escola Superior Agrária de Viseu, Estrada de Nelas, Quinta da Alagoa, 3500-606 Viseu, Portugal. \* Autor correspondente (e-mail: antoniojordao@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** aparas de madeira, análise instrumental, análise sensorial, cor, vinho.

**Resumo:** Tendo por objectivo contribuir para o estudo da evolução da cor dos vinhos ao longo do seu estágio em madeira, colocou-se um vinho tinto em contacto com 2 diferentes concentrações de aparas de madeira de carvalho, provenientes de duas espécies (*Q. pyrenaica* Willd. e *Q. petraea* Liebl.), durante 90 dias. A evolução da cor dos vinhos foi avaliada sensorialmente e instrumentalmente (antocianas totais, índice de polifenóis totais, intensidade e tonalidade da cor, percentagem de formas vermelhas e amarelas e ainda as coordenadas do espaço definidas pelo CIELAB) ao longo do tempo. Verificou-se que os vinhos conservados em contacto com aparas de madeira, apresentaram ao longo do tempo, um decréscimo ligeiramente mais acentuado dos valores em antocianas totais e da coordenada  $a^*$  do CIELAB. O índice de polifenóis totais, apresentou uma tendência para um ligeiro aumento nos vinhos conservados em contacto com as aparas de madeira relativamente ao vinho testemunha. Porém, constatou-se a inexistência de diferenças significativas ao nível da diferença total da cor dos vinhos ( $\Delta E^*$ ) definido pelo espaço das coordenadas do CIELAB. Tendência similar ao obtido nos parâmetros instrumentais da cor utilizados, foi também observada quando os vinhos foram avaliados sensorialmente ao nível da cor.

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação dos vinhos em madeira, especialmente dos vinhos tintos, desempenha um papel de primordial importância nas características físico-químicas e sensoriais destes. Vários factores condicionam a forma como essas características, evoluem ao longo do tempo, salientando-se: a origem botânica da madeira [1;2], a proveniência geográfica, os tratamentos térmicos a que a madeira é sujeita durante as operações de tanoaria [3;4], a utilização de barricas novas *versus* usadas [5;6], as trocas gasosas através da madeira e a constante dissolução do oxigénio no vinho [7;8], a extracção de alguns compostos da madeira para o vinho [9;10] e ainda o tempo de estágio [6;11]. Segundo Revilla e González-Sanjosé [1], a conservação do vinho em contacto com a madeira de carvalho, desempenha um importante papel na formação de derivados antociânicos, resultando daqui a obtenção de melhores qualidades cromáticas por parte dos vinhos estagiados em madeira. A estabilização das antocianinas livres, é ainda favorecida pela incorporação através dos poros da madeira, de quantidades limitadas de oxigénio, formando-se assim, combinações mais estáveis e pouco sensíveis à descoloração efectuada pela presença de sulfuroso [12]. A generalidade dos estudos [13;14] refere ainda, um aumento da complexidade organoléptica dos vinhos conservados em madeira.

Atendendo ao facto das características associadas à cor dos vinhos, ser um parâmetro de qualidade cada vez mais relevante nas características qualitativas destes, o presente trabalho teve por objectivo efectuar uma análise comparativa entre os resultados obtidos por via instrumental e os resultados obtidos através de um painel de provadores, da evolução das

características cromáticas de um vinho conservado em contacto com aparas de madeira de carvalho provenientes de duas espécies botânicas (*Q. pyrenaica* Willd. e *Q. petraea* Liebl.).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

O vinho utilizado (colheita de 2004), foi elaborado a partir de 4 castas tintas em igual proporção (*Touriga Nacional*, *Alfrocheiro Preto*, *Jaen* e *Tinta Roriz*). As aparas de madeira de carvalho usadas foram de duas espécies de carvalho: *Q. pyrenaica* Willd. (floresta nacional, região do *Gerês*) e *Q. petraea* Liebl. (floresta Francesa, região de *Allier*). As características das aparas de madeira utilizadas, foram as seguintes: grão médio (3.0 a 3.5 mm) e tosta média (20 minutos a uma temperatura na superfície da madeira de 160-170 °C).

Após a fermentação maloláctica, o vinho foi conservado em contacto com as diferentes aparas de madeira (concentrações de 2 e 5 g/L, para ambas as espécies utilizadas) durante 90 dias, a uma temperatura de 16-18 °C. Todos os ensaios, foram efectuados à escala laboratorial (20 litros para cada ensaio) e em duplicado.

### 2.2. Métodos

O acompanhamento da evolução da cor, efectuou-se através da determinação do índice de polifenóis totais, antocianas totais, intensidade e tonalidade da cor, segundo as metodologias recomendadas pelo OIV<sup>[15]</sup>. Avaliou-se ainda, a percentagem de formas vermelhas e amarelas. Recorreu-se também à determinação das coordenadas do espaço definidas pelo CIELAB<sup>[16]</sup> –  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (verde ao vermelho) e  $b^*$  (azul ao amarelo). A diferença total de cor foi calculada através da expressão:  $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ . Todas as determinações foram efectuadas em duplicado.

Para as provas organolépticas recorreu-se a um painel de provadores constituído por 10 consumidores usuais de vinho. Os vinhos foram avaliados utilizando vários descritores sensoriais, nomeadamente ao nível da cor (intensidade da coloração vermelha e castanha) e da apreciação global. Foi utilizada uma escala de intensidade (de 1 *menos intenso/mediocre* a 5 *muito intenso/excelente*).

## 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 3.1. Análise instrumental

A tabela 1, apresenta a evolução dos diferentes parâmetros cromáticos analisados nos vinhos conservados em contacto com os dois tipos/concentrações de aparas de madeira utilizadas. É possível constatar que no geral, ocorreu um decréscimo generalizado dos teores em antocianas totais em todos os vinhos, tendo no entanto esse decréscimo sido mais notado nos vinhos conservados com 5 g/L aparas de madeira (independentemente da espécie botânica de carvalho usada). De salientar que o decréscimo observado para o teor em antocianas totais não se reflectiu na intensidade e tonalidade da cor, na absorvância a 520 nm e ainda na percentagem de formas vermelhas presentes nos diversos vinhos.

A utilização das coordenadas do espaço definido pelo CIELAB, permite obter valores mais precisos e próximos da forma como a cor é apercebida pelo olho humano. Assim, no caso da coordenada  $a^*$  (vermelho), embora as diferenças não tenham sido também muito evidentes, constata-se porem a existência de um ligeiro decréscimo dos valores de  $a^*$  nos vinhos conservados em contacto com as aparas de madeira na dose mais elevada (5 g/L). Esta tendência está de acordo com Jordão *et al.*<sup>[17]</sup>, tendo estes autores observado que em soluções modelo de vinho, ocorre um decréscimo mais acentuado da malvidina-3-glucósido em contacto com compostos provenientes da madeira de carvalho, assim como um maior



decréscimo dos valores da coordenada  $a^*$  do CIELAB. Para as coordenadas  $L^*$  e  $b^*$ , não se observou a existência de diferenças entre os vinhos.

Com o objectivo de estudar a evolução da diferença de cor total entre os vinhos conservados em contacto com aparas de madeira e o mesmo vinho mas conservado na ausência das aparas, procedeu-se à determinação dos valores de  $\Delta E^*$ , tendo por base as coordenadas do CIELAB (figura 1).

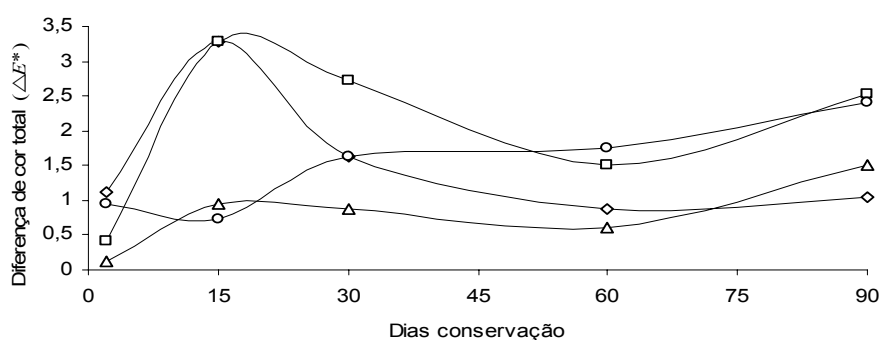
**Tabela 1** – Evolução dos vários parâmetros associados à cor (valores médios), nos vinhos tintos conservados em contacto com aparas de madeira de carvalho.

| Parâmetros | Dias de conservação |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 30                  |       |       |       |       | 60    |       |       |       |       | 90    |       |       |       |       |
|            | Códigos dos vinhos  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|            | VT                  | VF2   | VF5   | VP2   | VP5   | VT    | VF2   | VF5   | VP2   | VP5   | VT    | VF2   | VF5   | VP2   | VP5   |
| AT         | 190.8               | 185.0 | 177.1 | 183.7 | 174.6 | 174.1 | 172.1 | 153.9 | 167.8 | 160.1 | 169.7 | 170.8 | 157.4 | 165.5 | 158.9 |
| I.P.T.     | 53.1                | 55.6  | 57.0  | 57.5  | 59.9  | 51.2  | 52.9  | 52.8  | 53.8  | 56.6  | 51.1  | 52.8  | 52.4  | 52.8  | 56.1  |
| I.C.       | 10.0                | 9.8   | 9.5   | 10.0  | 9.9   | 10.85 | 10.67 | 10.41 | 11.11 | 11.07 | 10.57 | 10.60 | 10.17 | 10.80 | 10.58 |
| Abs 620    | 1.27                | 1.24  | 1.20  | 1.27  | 1.27  | 1.42  | 1.39  | 1.35  | 1.48  | 1.50  | 1.32  | 1.32  | 1.25  | 1.35  | 1.33  |
| Abs 520    | 4.61                | 4.52  | 4.38  | 4.57  | 4.50  | 4.98  | 4.91  | 4.80  | 5.07  | 5.01  | 4.90  | 4.91  | 4.73  | 5.01  | 4.88  |
| Abs 420    | 4.13                | 4.04  | 3.94  | 4.11  | 4.10  | 4.45  | 4.37  | 4.25  | 4.54  | 4.55  | 4.35  | 4.35  | 4.19  | 4.44  | 4.37  |
| % F.A.     | 41.3                | 41.2  | 41.4  | 41.1  | 41.4  | 41.0  | 40.9  | 40.8  | 40.8  | 41.1  | 41.1  | 41.0  | 41.1  | 41.1  | 41.3  |
| % F.V.     | 46.1                | 46.1  | 46.1  | 45.7  | 45.4  | 45.8  | 46.0  | 46.1  | 45.6  | 45.2  | 46.3  | 46.3  | 46.5  | 46.3  | 46.1  |
| T.C.       | 0.89                | 0.89  | 0.89  | 0.89  | 0.91  | 0.89  | 0.89  | 0.88  | 0.89  | 0.90  | 0.88  | 0.88  | 0.88  | 0.88  | 0.89  |
| $L^*$      | 69.7                | 70.8  | 71.2  | 69.5  | 69.7  | 70.8  | 71.4  | 71.8  | 70.5  | 70.7  | 70.6  | 71.4  | 71.9  | 70.7  | 71.2  |
| $a^*$      | 25.4                | 24.0  | 23.6  | 24.5  | 23.7  | 24.1  | 23.5  | 23.0  | 23.6  | 22.9  | 24.2  | 23.4  | 22.8  | 23.7  | 22.7  |
| $b^*$      | 12.3                | 11.7  | 11.6  | 12.1  | 12.2  | 11.3  | 10.9  | 10.7  | 11.0  | 11.0  | 11.9  | 11.5  | 11.4  | 11.7  | 11.5  |

**Parâmetros:** A.T. – Antocianas totais (mg/L); I.P.T. – Índice de polifenóis totais; I.C. – Intensidade da cor; Abs 620 – Absorvância a 620 nm; Abs 520 – Absorvância a 520 nm; Abs 420 – Absorvância a 420 nm; % F.A. – Percentagem de formas amarelas; % F.V. – Percentagem de formas vermelhas; T.C. – Tonalidade da cor;  $L^*$  – Luminosidade;  $a^*$  – (vermelho);  $b^*$  – (amarelo). **Vinhos:** VT – Vinho testemunha; VF2 – vinho com aparas *Q. petraea* (2 g/L); VF5 – vinho com aparas *Q. petraea* (5 g/L); VP2 – vinho com aparas *Q. pyrenaica* (2 g/L); VP5 – vinho com aparas *Q. pyrenaica* (5 g/L).

Segundo Negueruela *et al.* [18], o olho humano consegue identificar diferenças de coloração nos vinhos colocados em copos de prova para valores de  $\Delta E^*$  superiores a 5 unidades.

Os resultados obtidos, apontam para que a diferença de cor dos vinhos, tenha ao longo do tempo considerado, apresentado um máximo após 15 dias de conservação no vinho com aparas de madeira da espécie *Q. petraea* ( $\Delta E^*_1$  e  $\Delta E^*_2$ ), seguindo-se um contínuo decréscimo dos valores.

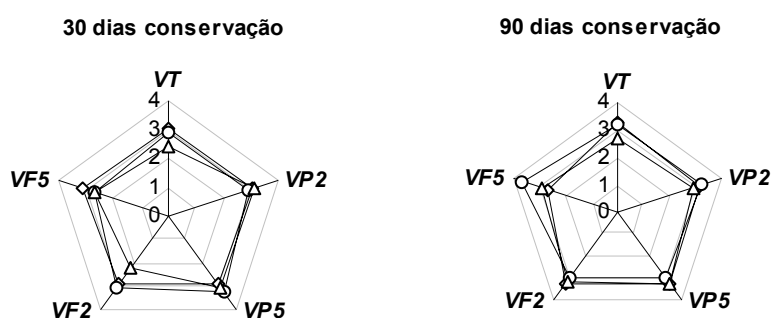


**Figura 1** – Evolução ao longo do tempo dos valores médios da diferença de cor total dos vinhos tintos em contacto com aparas de madeira de carvalho. **Legenda:** —○—  $\Delta E^*_1$  (Diferença de cor total entre o vinho testemunha e o vinho com 2g/L de aparas de *Q. petraea*); —□—  $\Delta E^*_2$  (Diferença de cor total entre o vinho testemunha e o vinho com 5g/L de aparas de *Q. petraea*); —△—  $\Delta E^*_3$  (Diferença de cor total entre o vinho testemunha e o vinho com 2 g/L de aparas de *Q. pyrenaica*); —○—  $\Delta E^*_4$  (Diferença de cor total entre o vinho testemunha e o vinho conservado com 5 g/L de aparas de *Q. pyrenaica*).

No caso dos vinhos conservados em contacto com as aparas de carvalho da espécie *Q. pyrenaica*, verificou-se uma ligeira tendência para um aumento dos valores da diferença de cor total relativamente ao vinho testemunha ( $\Delta E^*_3$  e  $\Delta E^*_4$ ) ao longo do tempo. De salientar, que em qualquer dos ensaios efectuados o valor de  $\Delta E^*$ , nunca foi superior a 5 unidades e como tal, segundo Negueruela *et al.* [18], será pois difícil de distinguir a existência de diferenças na coloração dos vinhos por parte dos provadores.

### 3.1. Análise sensorial

Com o objectivo de avaliar o potencial impacto da conservação dos vinhos em contacto com as aparas de madeira, na percepção da cor em termos sensoriais efectuaram-se duas sessões de prova após 30 e 90 dias de conservação. Os resultados obtidos (figura 2), após 30 dias de conservação, demonstram a não existência de diferenças dignas de registo entre os vinhos, ao nível do perfil da cor. Estes resultados, vão pois no mesmo sentido dos resultados obtidos por via instrumental. Na segunda sessão de provas efectuadas, após 90 dias de conservação, constatou-se que só ao nível do vinho conservado em contacto com 5 g/L de aparas da espécie *Q. petraea* (VF5), é que os provadores identificaram a existência de um aumento ligeiro da intensidade da coloração castanha relativamente aos restantes vinhos.



**Figura 2** – Resultados da avaliação sensorial da cor (vermelho e castanho) e da apreciação global dos vinhos tintos conservados com diferentes aparas de madeira de carvalho. **Legenda:** (Vinhos ver legenda da tabela 1); **Parâmetros sensoriais:** -○- Intensidade da coloração vermelha; -○- Intensidade da coloração castanha; -△- Apreciação global.

## 4. CONCLUSÕES

Foi possível verificar que para as doses de aparas de madeira de carvalho utilizadas e para o tempo de conservação considerado, o impacto sobre a cor dos vinhos foi reduzido, quer em termos dos resultados obtidos por via instrumental, quer em termos dos resultados obtidos nas provas organolépticas efectuadas. Novos estudos deverão ser efectuados, nomeadamente utilizando-se doses de aparas mais elevadas, tempos de conservação mais dilatados, assim como recorrer-se ou não arejamentos periódicos dos vinhos, entre outros aspectos.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] M.L. González-San José, I. Revilla - Eur. Food Res. Technol. 213 (2001) 281-285
- [2] G. De Coninck, A.M. Jordão, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano - J. Int. Sci. Vigne Vin 40 (2006) 1-10
- [3] A.M. Jordão, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano - Mitt. Klosterneuburg 55 (2005) 31-40
- [4] A.M. Jordão, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano - Holzf. (2007) (aceite para publicação)
- [5] J.P. Towey, A.L. Waterhouse - Am. J. Enol. Vitic. 47 (1996) 163-172
- [6] T.G. Cerdán, D.T. Goñi, C.A. Azpilicueta - Aust. J. Grape Wine Res. 8 (2002) 140-145
- [7] N. Vivas - Bull. O.I.V. 73 (2000) 79-108

- [<sup>8</sup>] L.J. Pérez-Prieto, J.M.L. Roca, A.M. Cutillas, M.F. Pardo, E. Gómez-Plaza - *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5444-5449
- [<sup>9</sup>] M. Moutounet, P.H. Rabier, J.L. Puech, E. Verette, J.M. Barrillere - *Sci. Aliments* 9 (1989) 35-51
- [<sup>10</sup>] A.M. Jordão, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano - *Sth Afric. J. Enol. Vitic* 26 (2005) 25-31
- [<sup>11</sup>] M. Ortega-Heras, C. Gonzalez-Huerta, P. Herrera, M.L. González-SanJosé - *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 341-350
- [<sup>12</sup>] P. Chatonnet, J.M. Ricardo-da-Silva, D. Dubourdieu - *Rev. Fr. Oenol.* 165 (1997) 44-48
- [<sup>13</sup>] M.R. Salinas, G.L. Alonso, G. Navarro, F. Pardo, J. Jimeno, M.D. Huerta - *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (1996) 134-144
- [<sup>14</sup>] E.M. Díaz-Plaza, J. Reyero, F. Pardo, M.R. Salinas - *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 139-145
- [<sup>15</sup>] Office International de la Vigne et Du Vin, Paris (1990)
- [<sup>16</sup>] C.I.E.: 2<sup>nd</sup> ed. Publication C.I.E. Central Bureau of the Commission Internationale de l'Eclairage 15, 2. Viena, (1986)
- [<sup>17</sup>] A.M. Jordão, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano - *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 377-381
- [<sup>18</sup>] A.I. Negueruela, J.F. Echávarri, F. Ayala, A.M. Lomas - *Zubía Monográfico* 7 (1995) 151-166



# EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ALGUMAS CASTAS TINTAS DA REGIÃO DO DÃO DURANTE A SUA MATURAÇÃO

*Fonseca<sup>1</sup>, H.; Silva<sup>1</sup>, L.R.; Coutinho\*, R..*

<sup>1</sup> Departamento das Indústrias Agro-Alimentares. Escola Superior Agrária de Viseu. Viseu, Portugal.  
Tel: 232446600 ; E-mail: [rcoutinho@esav.ipv.pt](mailto:rcoutinho@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** maturação, parâmetros físico-químicos, Região do Dão.

**Resumo:** Este trabalho consistiu na determinação e acompanhamento da evolução de alguns parâmetros físico-químicos durante o processo de maturação de seis castas tintas da região do Dão. Foram colhidas semanalmente cinco amostras para análise, ao longo do período de maturação. Dos resultados obtidos verificou-se um acréscimo do pH ao longo do período de controlo, com variações de 0,1-0,4 décimas na escala de pH. No que diz respeito à acidez total obteve-se um decréscimo, obtendo-se na última amostragem valores entre 4,2 a 6,5 g/L (expressa em ácido tartárico), sendo o Alvarelhão a casta com maior acidez. A casta Touriga nacional foi a que apresentou um grau brix mais elevado (22,6%).

## 1. INTRODUÇÃO

O controlo da maturação das uvas para vinificação é um aspecto determinante para a obtenção de vinhos de qualidade. A determinação das características físicas e químicas das uvas podem dar uma indicação preciosa para o técnico da sua evolução, do tipo de intervenções a fazer na vinha, bem como das correcções necessárias para obter um produto com as características desejadas.

Assim, parâmetros como o peso, volume e número de cachos podem dar uma indicação precisa da produção ao longo dos anos, estes dados complementados com a determinação da acidez total, pH, grau brix, álcool provável, teor em aromas, representam uma ferramenta indispensável para determinar o momento óptimo da sua colheita tendo em vista o potencial de cada uma das castas e sua aceitação no mercado.

Este trabalho teve como objectivos a determinação e acompanhamento da evolução de alguns parâmetros físico-químicos (peso, volume, acidez total, pH, grau Brix e álcool provável) ao longo do processo de maturação de 6 castas tintas (Alvarelhão, Alfrocheiro, Jaen, Tinta Pinheira, Tinta Roriz e Touriga Nacional) provenientes da Região do Dão (colheita de 2006). A colheita de amostras decorreu no período de maturação, tendo início a 10 de Agosto até 7 de Setembro com amostragens semanais.

Dos parâmetros analisados verificou-se que a sua evolução vem de encontro aos resultados publicados referentes a estudos na maturação, descrevem por um lado um aumento do álcool provável, grau brix e pH e uma diminuição da acidez total.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas 6 castas tintas (Alvarelhão, Alfrocheiro, Jaen, Tinta Pinheira, Tinta Roriz e Touriga Nacional) provenientes da Região do Dão (colheita de 2006), às quais foram efectuados análises semanais (peso, volume, acidez total, pH, grau Brix e álcool provável) ao longo do processo de maturação, no período de 10 de Agosto até 7 de Setembro. Para cada casta colheram-se 600 bagos em cada amostragem, seguidamente foram pesados, esmagados, mediu-se o volume obtido e determinou-se a acidez total, grau brix, pH e álcool provável. As análises foram efectuadas em triplicado.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De seguida, são apresentados os resultados das análises ao pH, à acidez total, ao grau Brix e ao álcool provável efectuadas durante o período de estudo.

Pela observação do quadro 1 podemos verificar que houve um acréscimo do pH ao longo do período de controlo, com variações de 0,1-0,4 décimas na escala de pH.

| <b>pH</b>               |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                         | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Alvarelhão</b>       | -               | 3,57            | 3,49            | 3,56            | 3,67            |
| <b>Jaen</b>             | -               | 3,91            | 3,73            | 3,80            | 3,90            |
| <b>Tinta Pinheira</b>   | -               | 3,67            | 3,53            | 3,75            | 3,72            |
| <b>Tinta Roriz</b>      | 3,59            | 3,81            | 3,78            | 3,81            | 3,98            |
| <b>Touriga Nacional</b> | 3,35            | 3,51            | 3,44            | 3,56            | 3,73            |
| <b>Alfrocheiro</b>      | 3,29            | 3,47            | 3,45            | 3,51            | 3,02            |

**Quadro 1** – Valores do pH das amostras recolhidas.

No que diz respeito à acidez total (quadro 2) obteve-se um decréscimo, tendo-se obtido na última amostragem valores entre 4,2 a 6,5 g/L (expressa em ácido tartárico), sendo a casta com maior acidez o Alvarelhão.

| <b>Acidez Total (g/L ácido tartárico)</b> |                 |                 |                 |                 |                 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Alvarelhão</b>                         | -               | 9,3             | 7,9             | 6,0             | 6,5             |
| <b>Jaen</b>                               | -               | 5,2             | 5,6             | 4,9             | 4,2             |
| <b>Tinta Pinheira</b>                     | -               | 7,0             | 5,6             | 5,2             | 5,0             |
| <b>Tinta Roriz</b>                        | 7,1             | 6,3             | 5,6             | 4,1             | 4,7             |
| <b>Touriga Nacional</b>                   | 11,3            | 9,1             | 7,1             | 5,8             | 5,6             |
| <b>Alfrocheiro</b>                        | 11,5            | 7,7             | 6,4             | 5,3             | 4,6             |

**Quadro 2** – Valores da acidez total (expressa em g/L de ác. tartárico) das amostras recolhidas.

O grau provável (quadro 4) e o grau brix (quadro 3) apresentaram um aumento durante o período em estudo, respectivamente de 8,0-13,5% e 14,7-22,6%.

| <b>Grau Brix (%)</b>    |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                         | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Alvarelhão</b>       | -               | 14,9            | 16,3            | 19,5            | 21,8            |
| <b>Jaen</b>             | -               | 15,6            | 16,5            | 19,2            | 20,0            |
| <b>Tinta Pinheira</b>   | -               | 14,5            | 14,8            | 17,9            | 19,5            |
| <b>Tinta Roriz</b>      | 16,9            | 17,1            | 17,7            | 19,5            | 21,5            |
| <b>Touriga Nacional</b> | 15,2            | 16,5            | 17,4            | 20,7            | 22,6            |
| <b>Alfrocheiro</b>      | 14,7            | 16,9            | 18,1            | 20,3            | 21,4            |

**Quadro 3** – Valores do grau Brix das amostras recolhidas.

| <b>Álcool provável (%)</b> |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                            | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Alvarelhão</b>          | -               | 8,25            | 8,20            | 11,20           | 13,20           |
| <b>Jaen</b>                | -               | 8,25            | 9,00            | 10,30           | 12,00           |
| <b>Tinta Pinheira</b>      | -               | 7,10            | 7,20            | 10,00           | 11,10           |
| <b>Tinta Roriz</b>         | 9,50            | 9,75            | 10,20           | 11,90           | 13,00           |
| <b>Touriga Nacional</b>    | 8,00            | 9,10            | 9,20            | 12,00           | 13,00           |
| <b>Alfrocheiro</b>         | 8,00            | 9,20            | 8,00            | 12,00           | 13,50           |

**Quadro 4** – Valores do álcool provável das amostras recolhidas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. D. Cardoso, J. Carvalheira, M. A. Coimbra - *Tecnologia dos vinhos tintos*. Direcção Regional da Beira Litoral (2005).  
 C. Navarre - *Técnicas de produção do vinho*. Publicações Europa-América (1997).

## ESTUDO DO EFEITO DAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS NA COR E NO SABOR DE VINHOS DO PORTO

*Cruz\*, P.; Mateus\*, N.; Santos\*\*, J.A.; Victor de Freitas\**

\*Departamento de Química da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto;

\*\* PROENOL- Indústria Biotecnológica, Lda.

Este trabalho teve por objectivo o estudo de diferentes actividades enzimáticas (pectolíticas) presente em extractos resultantes da fermentação de microrganismos (*Aspergillus niger*) e em duas preparações enzimáticas fornecidas pela empresa de produtos enológicos Proenol (ProZym Maceração e ProZym Colheita), com vista à libertação de compostos polifenólicos e à extracção de polissacáridos presentes na película de uvas responsáveis pela cor e sabor de vinhos tintos. Foram realizados estudos com três enzimas puras (pectinase, celulase e glucosidase) e com as duas preparações enzimáticas, em mostos fermentados (*Saccharomyces cerevisiae*) e não fermentados.

De um modo geral, verificou-se que as enzimas promoviam o aumento da intensidade de cor numa primeira fase (cerca de 24-27 horas) seguindo-se uma diminuição dessa intensidade para valores iguais ou inferiores ao do ensaio em branco (sem enzimas).

Esta diminuição de cor ocorria simultaneamente com o aparecimento de sedimentos no fundo dos frascos, correspondente a material vegetal insolúvel, como por exemplo fragmentos de polissacáridos que fazem parte das paredes celulares e sobre as quais as enzimas actuaram. Estes sedimentos têm a propriedade de adsorver à sua superfície as antocianinas (pigmentos vermelhos), diminuindo a sua concentração em solução e consequentemente a sua cor.

Contudo, apesar da utilização de enzimas pectolíticas ter-se mostrado pouco eficaz na extracção das antocianinas das películas, o mesmo não aconteceu com os taninos condensados e os polissacáridos. Efectivamente, o uso de enzimas mostrou-se eficaz na libertação de outros compostos comparativamente aos ensaios em branco (sem enzima): verificou-se um aumento do índice de fenóis totais, um aumento da concentração de taninos condensados, um aumento do poder tanante, uma diminuição do índice de diálise e um aumento de polissacáridos presentes nos extractos. Estas variações, são indicativas de que estas enzimas poderão desempenhar um papel importante a nível do sabor e da estabilidade organoléptica dos vinhos.

Comparando as enzimas comerciais Prozym Maceração e Prozym Colheita, verifica-se que esta última tem maior capacidade para libertar os compostos fenólicos das películas. Contudo, de todas as enzimas estudadas individualmente, a pectinase e a celulase demonstraram ser as que promovem uma extracção mais eficiente de compostos polifenólicos e polissacáridos presentes nas uvas. Deste modo, deveria-se apostar em preparações enzimáticas comerciais com maiores concentrações destas enzimas.



# EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CINCO CASTAS BRANCAS DA REGIÃO DO DÃO DURANTE A SUA MATURAÇÃO

*Fonseca, H.; Coutinho, R.; Silva\*, L.R.*

<sup>1</sup> Departamento das Indústrias Agro-Alimentares. Escola Superior Agrária de Viseu. Viseu, Portugal.  
Tel: 232446600; E-mail: [luis@esav.ipv.pt](mailto:luis@esav.ipv.pt)

**Palavras-chave:** maturação, parâmetros físico-químicos, Região do Dão.

**Resumo:** Este trabalho consistiu na determinação e acompanhamento da evolução de alguns parâmetros físico-químicos durante o processo de maturação de cinco castas brancas da região do Dão. Foram efectuadas cinco amostragens ao longo do período de maturação, com uma periodicidade semanal. Dos resultados obtidos verificou-se um acréscimo do pH ao longo do tempo, com variações de 0,1-0,3 décimas na escala de pH, sendo a casta Verdelho a que apresenta a maior subida. No que diz respeito à acidez total verificámos um decréscimo em todas as castas, apresentando na última amostragem valores que variaram entre 4,5 a 6,2 g/L (expressa em ácido tartárico). O álcool provável e o grau brix apresentaram um aumento durante o período em estudo, apresentando, respectivamente 7,3-13,3% e 14,5-22,3%.

## 1. INTRODUÇÃO

O controlo da maturação das uvas para vinificação é um aspecto determinante para a obtenção de vinhos de qualidade. A determinação das características físicas e químicas das uvas podem dar uma indicação preciosa para o técnico da sua evolução, do tipo de intervenções a fazer na vinha, bem como das correcções necessárias para obter um produto com as características desejadas.

Assim, parâmetros como o peso, volume e número de cachos podem dar uma indicação precisa da produção ao longo dos anos, estes dados complementados com a determinação da acidez total, pH, grau brix, álcool provável, teor em aromas, representam uma ferramenta indispensável para determinar o momento óptimo da sua colheita tendo em vista o potencial de cada uma das castas e sua aceitação no mercado.

Este trabalho teve como objectivos a determinação e acompanhamento da evolução de alguns parâmetros físico-químicos (peso, volume, acidez total, pH, grau Brix e álcool provável) ao longo do processo de maturação de 5 castas brancas (Encruzado, Verdelho, Cerceal, Arinto e Borrado das Moscas) provenientes da Região do Dão (colheita de 2006). A colheita de amostras decorreu no período de maturação, tendo-se iniciado a 10 de Agosto até 7 de Setembro com amostragens semanais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas 5 castas brancas (Encruzado, Verdelho, Cerceal, Arinto e Borrado das Moscas) provenientes da Região do Dão (colheita de 2006), às quais foram efectuadas análises semanais (peso, volume, acidez total, pH, grau Brix e álcool provável) ao longo do processo de maturação, no período de 10 de Agosto até 7 de Setembro.

Para cada casta colheram-se 600 bagos em cada amostragem, seguidamente foram pesados, esmagados, mediu-se o volume obtido e determinou-se a acidez total, grau brix, pH e álcool provável. As análises foram efectuadas em triplicado.

### 3. RESULTADOS

Os resultados das análises físico-químicas efectuadas durante o período em estudo estão apresentados seguidamente.

Os valores obtidos para o pH, estão apresentados no quadro 1, verificou-se um acréscimo ao longo do tempo, com variações de 0,1-0,3 décimas na escala de pH, sendo a casta Verdelho a que apresentou a maior subida.

| <b>pH</b>                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                           | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Encruzado</b>          | 3,32            | 3,37            | 3,29            | 3,43            | 3,58            |
| <b>Verdelho</b>           | 3,41            | 3,66            | 3,52            | 3,67            | 3,98            |
| <b>Cerceal</b>            | -               | 3,49            | 3,36            | 3,50            | 3,62            |
| <b>Borrado das Moscas</b> | -               | 3,47            | 3,42            | 3,55            | 3,57            |
| <b>Arinto</b>             | -               | 3,67            | 3,52            | 3,66            | 3,76            |

**Quadro 1** – Valores do pH das amostras recolhidas.

No que diz respeito à acidez total (quadro 2) verificámos um decréscimo em todas as castas, apresentando na última amostragem valores que variaram entre 4,5 a 6,2 g/L (expressa em ácido tartárico).

| <b>Acidez Total (g/L ácido tartárico)</b> |                 |                 |                 |                 |                 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Encruzado</b>                          | 10,4            | 8,3             | 6,8             | 5,6             | 4,5             |
| <b>Verdelho</b>                           | 10,9            | 8,0             | 7,0             | 5,4             | 5,3             |
| <b>Cerceal</b>                            | -               | 8,6             | 7,2             | 6,0             | 6,0             |
| <b>Borrado das Moscas</b>                 | -               | 9,2             | 6,8             | 6,4             | 6,2             |
| <b>Arinto</b>                             | -               | 6,9             | 7,1             | 5,5             | 5,0             |

**Quadro 2** – Valores da acidez total (expressa em g/L de ác. tartárico) das amostras recolhidas.

Pela observação dos quadros 3 e 4 verificou-se que o grau brix e o álcool provável apresentaram um aumento durante o período em estudo, respectivamente 7,3-13,3 ° e 14,5-22,3%.

| <b>Grau Brix (%)</b>      |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                           | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Encruzado</b>          | 15,6            | 16,7            | 18,6            | 20,7            | 22,3            |
| <b>Verdelho</b>           | 15,7            | 17,3            | 17,9            | 19,6            | 21,8            |
| <b>Cerceal</b>            | -               | 14,5            | 15,8            | 16,8            | 19,3            |
| <b>Borrado das Moscas</b> | -               | 14,9            | 16,0            | 18,1            | 19,3            |
| <b>Arinto</b>             | -               | 16,0            | 16,5            | 18,9            | 22,0            |

**Quadro 3** – Valores do grau Brix das amostras recolhidas.

| <b>Álcool provável (%)</b> |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                            | <b>10-08-06</b> | <b>17-08-06</b> | <b>24-08-06</b> | <b>31-08-06</b> | <b>07-09-06</b> |
| <b>Encruzado</b>           | 8,00            | 9,60            | 10,20           | 11,60           | 13,30           |
| <b>Verdelho</b>            | 8,50            | 7,30            | 8,20            | 9,20            | 11,00           |
| <b>Cerceal</b>             | -               | 7,20            | 8,50            | 10,20           | 12,00           |
| <b>Borrado das Moscas</b>  | -               | 7,20            | 8,50            | 10,20           | 12,00           |
| <b>Arinto</b>              | -               | 8,10            | 8,40            | 10,50           | 12,50           |

**Quadro 4** – Valores do álcool provável das amostras recolhidas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Curvelo – Garcia, A.S.** (1998). *Controlo de Qualidade dos Vinhos*. Lisboa, Instituto da Vinha e do vinho.
- Navarre C.** (1997). *Técnicas de produção do vinho*. Publicações Europa-América, LDA.
- De Rosa, Tullio** (1998) – *Tecnologia de los Vinos Blancos*. Madrid, Ediciones Mundi-prensa.

## INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE KIWI MINIMAMENTE PROCESSADO

*Rocha<sup>1</sup>, A.M.C.N.; Drieghe, K.<sup>2</sup> e Morais, A.M.M.B.<sup>2\*</sup>*

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200 465 Porto, Portugal, adarocho@fcna.up.pt

<sup>2</sup>Escola Superior de Biotecnologia, UCP, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200 - 072 Porto, Portugal; \*e-mail: amorais@esb.ucp.pt

O interesse pelo valor nutricional do kiwi tem vindo a aumentar e diversos estudos que comprovam a sua riqueza nutricional foram já realizados. O kiwi tem um teor em vitamina C muito elevado, contém também magnésio, e em contrapartida, o teor em sódio e em potássio, é muito baixo. O kiwi é ainda considerado uma boa fonte de fibra e um dos poucos alimentos que combina um baixo teor em gordura com uma elevada concentração de vitamina E.

Uma nova categoria de produtos os *minimamente processados* (MP) surgiu para dar resposta às exigências crescentes dos consumidores em relação à nutrição, à saúde e ao bem-estar físico, associadas à mudança gradual do estilo de vida das famílias. Estes produtos são apresentados ao consumidor convenientemente descascados, descaroçados ou cortados em embalagens adequadas, com características de produto fresco e prontos a utilizar.

Neste estudo, foi avaliado o efeito do armazenamento sob vácuo na qualidade de kiwi minimamente processado (variedade *Hayard*). Os kiwis armazenados sob vácuo mantiveram a firmeza, apresentaram um teor mais elevado de vitamina C e perderam menos água, do que os armazenados ao ar, no entanto as alterações de cor foram mais severas, devido ao desenvolvimento de translucência.

# FABRICO DE IOGURTE COM INCORPORAÇÃO DE CONCENTRADOS LÍQUIDOS DE PROTEÍNAS DO SORO OBTIDOS POR ULTRAFILTRAÇÃO

Gândara, T.\*<sup>1</sup>, Gomes, D.<sup>2</sup>, Rodrigues da Silva, L.<sup>1</sup>, Castanheira, É.<sup>2</sup>, Noronha, J.<sup>2</sup>, Dias Pereira, C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento das Indústrias Agro-Alimentares. Escola Superior Agrária de Viseu. Quinta da Alagoa. 3500-606 Viseu Tel +351-232446600

<sup>2</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia Alimentar. Escola Superior Agrária de Coimbra. Bencanta. 3040-316 Coimbra Tel +351-239802940

\* Email: tegandara@gmail.com

**Palavras-chave:** soro lácteo, concentrado líquido de proteínas do soro, ultrafiltração, iogurte.

**Resumo:** O presente trabalho teve como objectivo avaliar a possibilidade de utilizar concentrados líquidos de proteínas do soro (CLPS), obtidos por ultrafiltração (UF) no processo de fabrico de iogurte natural, bem como avaliar as diferenças físico-químicas e sensoriais entre os produtos convencionais e os produtos modificados.

Neste trabalho utilizou-se uma membrana de UF com um limite de separação de 20 kDa, que permite que a lactose e os sais passem pela membrana enquanto a quase totalidade das proteínas e a totalidade da gordura sejam retidas.

O CLPS obtido por ultrafiltração do soro foi termicamente desnaturado, homogeneizado e adicionado ao leite utilizado no fabrico de iogurte nas proporções de 0%, 5%, 10% e 20%. A composição do leite foi normalizada (relativamente ao extracto seco) através da adição de leite em pó.

Os resultados obtidos permitem verificar que a utilização das proteínas do soro no fabrico de iogurte se revelou como uma alternativa muito interessante para o seu aproveitamento industrial, ao mesmo tempo que podem obter-se produtos de elevada qualidade e aceitação sensorial.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Composição do soro

Apesar de ser um subproduto da indústria de lacticínios, o soro possui um elevado valor nutritivo, uma vez que grande parte dos componentes do leite permanece nele: 10 L de leite produzem cerca de 1kg de queijo (dependendo do tipo de leite e da tecnologia de fabrico) e cerca de 9 L de soro, o qual retém 6,3 % dos sólidos totais do leite.<sup>[1]</sup>

### 1.2. Produção de Soro em Portugal

Estima-se que a produção global de soro líquido, em Portugal, se situe entre 500 e 560 mil toneladas anuais.<sup>[2]</sup>

### 1.3. Problemas Ambientais Provocados pelo Soro

Em Portugal uma parte importante das indústrias de lacticínios não contempla a fase de valorização de resíduos o que agrava os problemas ambientais do sector, em particular das unidades com produção de queijo devido à rejeição de grandes quantidades de soro.<sup>[3]</sup>

O soro é um produto altamente poluente, com uma carência bioquímica de oxigénio (CBO<sub>5</sub>) de 32-60g por litro<sup>[4]</sup> devida à sua elevada composição em compostos orgânicos, pelo que a sua eliminação directa no ambiente pressupõe elevados custos económicos e ambientais. Estima-se que 100kg de soro líquido têm uma força poluente equivalente aos detritos produzidos num dia por 45 pessoas.<sup>[5]</sup>

### 1.4. Ultrafiltração (UF)

O termo ultrafiltração designa o processo de filtração tangencial por membrana que visa a separação dos componentes de uma solução tendo como base os diferentes pesos moleculares que apresentam. Existe uma solução de entrada (soro) e duas correntes de saída: O **retido** (ou concentrado) onde se encontram os componentes de maior dimensão que não conseguiram atravessar a membrana (totalidade da matéria gorda, proteínas e parte dos sais); O **filtrado**

constituído pelos componentes de menor peso molecular (lactose, fracção azotada não proteica e sais minerais).<sup>[6]</sup>

O limite de separação de uma membrana é determinado pelo peso molecular mais pequeno que se pode separar embora a forma das partículas separadas também tenha influência. Somente ficam retidas na membrana as espécies de peso molecular superior ao limite de separação.

## 2. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo avaliar o potencial de utilização de concentrados líquidos de proteínas do soro, obtidos por ultrafiltração, no fabrico de iogurte. Foi também avaliada a existência de diferenças físico-químicas e/ou sensoriais entre os produtos modificados e os produtos convencionais.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Produção do Concentrado Líquido de Proteínas do Soro (CLPS) e Produção dos Iogurtes

Para a produção de CLPS foi utilizada uma membrana orgânica DSS™ modelo 20K 3838-30, com uma superfície de 5,5 m<sup>2</sup> e um limite de exclusão de 20KDa.

O CLPS foi termicamente desnaturado a 95°C por 5 minutos, posteriormente homogeneizado a 50 bar num homogeneizador Rannie™, modelo Blue Top, tendo sido directamente incorporado no leite para a produção de iogurte nas taxas de 0%, 5%, 10% e 20%.

Para a produção dos iogurtes, após preparação, pasteurização (90°C) e homogeneização das misturas (200 bar), as mesmas foram inoculadas com fermentos EZAL MY 800 nas proporções definidas pelo fabricante, embaladas e incubadas a 43°C, até se atingir o pH desejado, após o que, foram imediatamente arrefecidas a 4°C.

### 3.2. Análises efectuadas ao Iogurte

Evolução do pH e da Acidez durante a fermentação; Determinação do Teor de Extracto Seco; Determinação do Teor de Cinzas; Determinação do pH, Determinação da Acidez;

Atributos de Textura (Stevens LFRA™ texture analyser);

Cor (Minolta™, Chroma Meter CR-200b);

Análise Sensorial (provas triangulares).

As análises foram efectuadas ao 1º, 8º e 15º dia após a produção dos iogurtes.

## 4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1. Análises Físico-Químicas

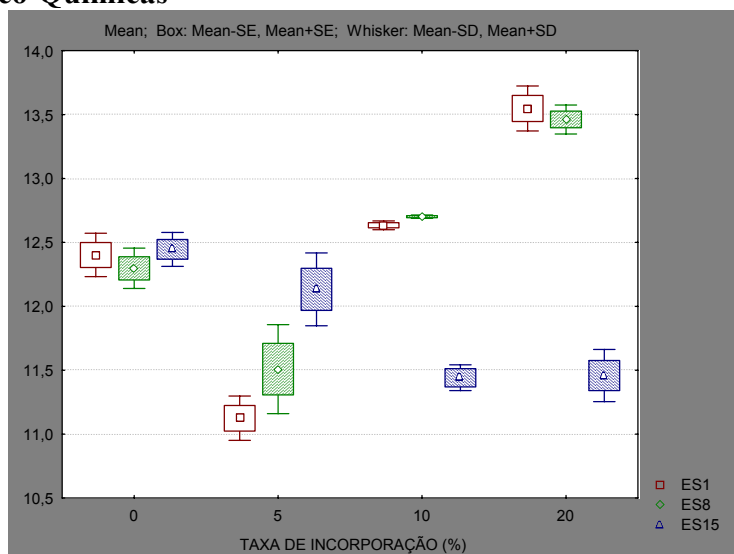
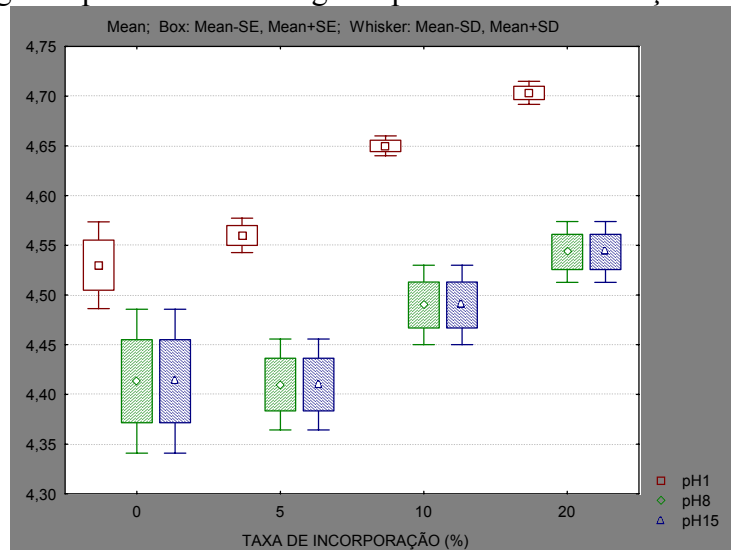


Figura 1. Teor do Extracto Seco dos iogurtes com diferentes taxas de incorporação ao 1º, 8º e 15º dia.

Pela análise da Figura 1 podemos observar que para a taxa de incorporação de 0% o extracto seco se manteve durante a conservação. No produto com adição de 5% de CLPS verifica-se um aumento do extracto seco apresentando no 15º dia valores semelhantes ao branco. Os iogurtes com incorporação de 10 e 20%, embora com um extracto seco igual ou superior ao branco de início, apresentam aos 15 dias um decréscimo acentuado deste parâmetro. Este facto carece de esclarecimento.

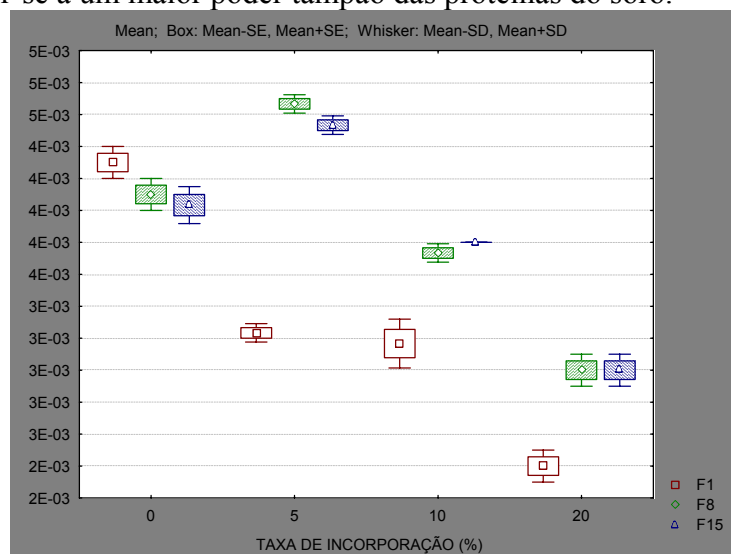
Em relação ao Teor de Cinzas verificou-se que este não sofre variações significativas nos quatro tipos de iogurtes produzidos ao longo do período de conservação.



**Figura 2.** pH dos iogurtes com diferentes taxas de incorporação ao 1º, 8º e 15º dia.

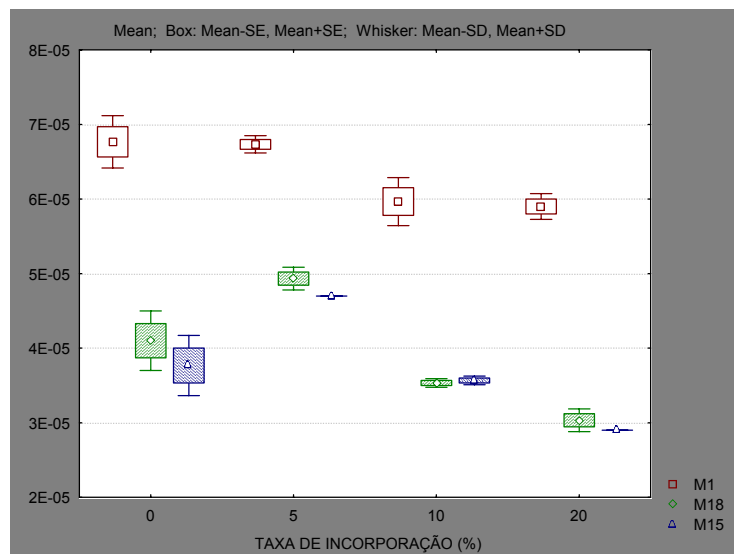
No que se refere à evolução do pH, verifica-se (Fig.2) que todos os iogurtes apresentam um comportamento semelhante ao longo do período de conservação, ocorrendo um decréscimo do pH entre os dias 1 e 8 de cerca de 0,15 unidades, mantendo-se constante posteriormente. Este abaixamento poderá significar que a fermentação ainda ocorreu durante a primeira semana, embora com uma velocidade mais lenta que durante a produção.

O pH final dos produtos com adição de CLPS nas taxas de 10 e 20% é mais elevado. Este facto poderá dever-se a um maior poder tampão das proteínas do soro.



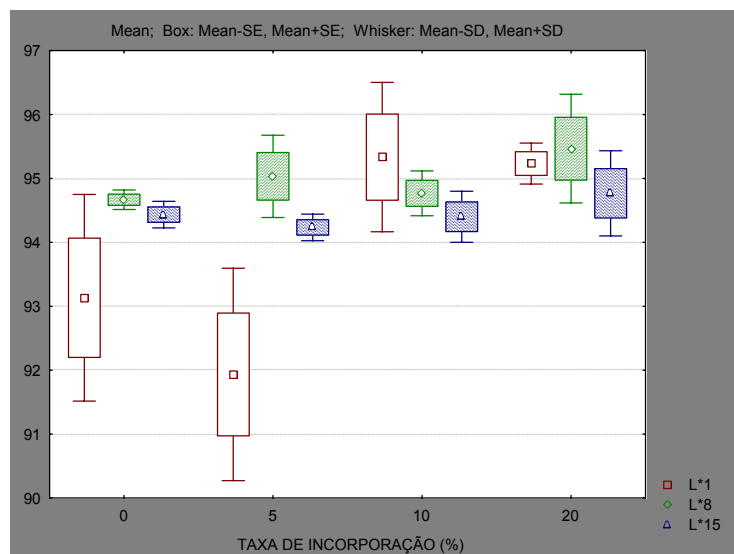
**Figura 3.** Firmeza dos iogurtes com diferentes taxas de incorporação ao 1º, 8º e 15º dia.

Pela análise da Figura 3 verifica-se que a firmeza dos iogurtes sem adição de CLPS decresce ao longo do tempo. No caso dos iogurtes com adição de concentrado, a firmeza é mais baixa no 1º dia e sobe para valores mais elevados ao longo do tempo. A firmeza do iogurte com uma taxa de incorporação de 5% é significativamente superior aos 15 dias em relação a todos os outros, enquanto no caso da taxa de 20% a firmeza é significativamente inferior a todos os outros. A menor firmeza no início da conservação, nos produtos que sofreram incorporações de CLPS poderá dever-se a uma baixa integração do concentrado de proteínas do soro na matriz do gel, e posterior integração ao longo do tempo. Ao fim de 8 e 15 dias os valores de coesividade, adesividade e elasticidade são iguais para todos os iogurtes produzidos (dados não apresentados).



**Figura 4.** Mastigabilidade dos iogurtes com diferentes taxas de incorporação ao 1º, 8º e 15º dia.

A mastigabilidade (Fig.4) decresce em todos os iogurtes ao longo do período de conservação, sendo o decréscimo mais acentuado na primeira semana. Ao fim de 8 e 15 dias, os valores da mastigabilidade para o iogurte com 5% de adição de CLPS são ligeiramente superiores a todos os outros.



**Figura 5.** Parâmetro L\* da cor dos iogurtes com diferentes taxas de incorporação ao 1º, 8º e 15º dia.



No que se refere aos parâmetros da cor determinados pelo sistema de Hunter ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), em relação a  $a^*$  e  $b^*$  pôde verificar-se que não existem diferenças significativas nos quatro tipos de iogurtes ao longo tempo.

Verifica-se que os valores de luminosidade ao fim de 8 e 15 dias são semelhantes para os quatro tipos de iogurtes produzidos. Os valores iniciais de  $L^*$  para os iogurtes com taxa de incorporação de 0 e de 5% são significativamente mais baixos que os restantes, o que significa que apresentam uma menor luminosidade, sendo por isso mais escuros.

#### 4.2. Análise Sensorial

As provas realizadas neste trabalho foram três provas triangulares, com objectivo de determinar se a adição de CLPS, usado em diferentes concentrações no fabrico de iogurtes naturais era detectada.

**Tabela 1.** Resultados referentes aos acertos e não acertos nas provas realizadas

| Prova | Acertos | Não Acertos |   |
|-------|---------|-------------|---|
| A     | 14      | 21          | <b>Prova A</b> – Branco e iogurte com adição de 5% de CLPS  |
| B     | 15      | 20          | <b>Prova B</b> – Branco e iogurte com adição de 10% de CLPS |
| C     | 20      | 15          | <b>Prova C</b> – Branco e iogurte com adição de 20% de CLPS |

Pela análise dos resultados da Tabela 1 e consultando a tabela referente ao número de provadores que, numa prova triangular têm de dar a resposta certa a dois níveis de significância, pode concluir-se que quer a 95% quer a 99%, a identificação de diferenças apenas foi significativa na Prova C. Pode então afirmar-se que apenas foram detectadas diferenças entre o branco e o iogurte com adição de 20% de CLPS.

#### 5. CONCLUSÕES

A adição de concentrado líquido de proteínas do soro ao leite para o fabrico de iogurte, demonstrou ser uma alternativa bastante viável para o aproveitamento deste subproduto.

São visíveis algumas diferenças, pouco significativas, entre as características dos iogurtes com e sem adição de concentrado líquido de proteína do soro, dependendo da taxa de incorporação.

Em termos de análise sensorial, as diferenças só foram detectadas pelos provadores para uma taxa de incorporação de 20%, sendo que, neste caso, há provadores que afirmam preferir o iogurte com a adição de CLPS.

Na opinião dos autores uma taxa de incorporação de CLPS de 10% seria compromisso ideal entre manter ao máximo as características originais do produto (tanto físico-químicas, como organolépticas) e aproveitar o soro obtido na produção de queijo.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Monzón C, Olano A. (1997). Produccion de bebidas alcoholicas a partir del soro de queserias. *Alimentaria*. 83.
- [2] Tecninvest (2000). *Estudo de mercado do soro lácteo em Portugal*.
- [3] Ferraz A (1998). Adaptação ambiental no sector dos lacticínios. *AIP Ambiente*. 22.
- [4] Cheryan M (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publishing Company.
- [5] Malcata FX, Pintado ME (1999). Estudos descritivos e tecnológicos sobre requeijão: caracterização e conservação. *Boletim de Biotecnologia*. 62: 19-26.
- [6] Pereira CD (2004). Aplicações da filtração tangencial na industria de lacticínios. Manual Técnico.



# FACTORES QUE INFLUENCIAM AS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE FARINHAS DE MILHO

*Brites, C.\*<sup>1</sup>; Trigo, M.J.<sup>1</sup>; Santos, C.<sup>1</sup>; Collar, C.<sup>2</sup>; Rosell, C.M.<sup>2</sup>*

1-INIAP, Estação Agronómica Nacional, DTPA, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

Tel +351-214403684 Fax +351-214413208 e-mail: [carlambrites@mail.telepac.pt](mailto:carlambrites@mail.telepac.pt)

2- IATA-CSIC, Cereal Group, Department of Food Science, POBox 73, 46100 Burjassot; Spain

**Palavras-chave:** milho, farinhas, reologia, RVA, TA-XT2

**Resumo:** O conhecimento empírico resultante do fabrico da broa tem comprovado que as propriedades reológicas das massas dependem em grande medida do tipo de endosperma do grão de milho (flint, dent, farinoso), da taxa de amido danificado que ocorre durante a moenda e da temperatura da água durante a amassadura, factores que irão ser objecto de estudo deste trabalho.

Avaliaram-se os efeitos do tipo de moenda (eléctrico, água) e da temperatura da água (25°C, 100°C) durante a amassadura para as propriedades reológicas de farinhas provenientes de quatro variedades de milho: Fandango- dent, regional amarelo; Pigarro- flint, regional branco; HA- dent, híbrido amarelo; HB- dent, híbrido branco.

As propriedades reológicas foram analisadas através dos perfis de viscosidade obtidos pelo analisador rápido de viscosidade- RVA, das curvas farinográficas e dos perfis de textura- TPA obtidos no texturómetro- TA-XT2.

Os resultados obtidos evidenciaram uma grande influência do tipo de endosperma para as diferenças detectadas nos perfis de viscosidade, sendo a variedade Pigarro (flint) a que apresenta os valores significativamente mais baixos. O tipo de moenda influencia significativamente a viscosidade máxima da suspensão de farinha sendo superior na obtida com o moinho de água.

A temperatura da água de amassadura aparece como o principal factor que determina as diferenças detectadas nos parâmetros registados pelo farinógrafo e nos perfis de textura obtidos com o texturómetro. A utilização da água a ferver diminui o tempo de desenvolvimento, aumenta a consistência, adesividade e elasticidade da massa. As diferenças de comportamento reológico detectado são devidas neste caso à gelatinização do amido que ocorreu devido à acção da temperatura, aspecto que é importante considerar quando as farinhas de milho se destinam ao fabrico de massas panares.

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados com a caracterização físico-química de farinhas de milho para a alimentação humana têm sido direccionados para a produção de cereais de pequeno-almoço, snacks e tortilhas [1, 2] ou incidindo no amido [3] que é o principal componente do endosperma do milho. Contudo, a utilização da farinha de milho para o fabrico de broa tem ainda hoje um papel de relevo na envolvente sócio-cultural do centro e norte de Portugal [4].

O conhecimento empírico tem demonstrado que a qualidade e especificidade da broa é determinada pela fermentação da massa com 'isco' ou massa mãe [4] e também por outros factores como sejam o tipo de variedade de milho (flint, dent, farinoso), o processo de moenda/taxa de amido danificado e a temperatura da água de amassadura.

Num estudo anterior [5], caracterizou-se o perfil de viscosidades de uma colecção de germoplasma que engloba linhas puras, híbridos e variedades regionais de milhos e seleccionaram-se quatro variedades para avaliar o efeito do tipo de moenda e da temperatura da água durante a amassadura na reologia da massa, avaliada pelo farinógrafo e texturómetro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As farinhas analisadas foram provenientes de quatro variedades de milho (Fandango- dent, regional amarelo; Pigarro- flint, regional branco; HA- dent, híbrido amarelo; HB- dent, híbrido branco) cujo grão foi moído em dois moinhos de mós de pedra com sistemas de movimentação diferentes (a água-MA e eléctrico-ME). As duas farinhas obtidas de cada variedade foram peneiradas por uma malha de 500µm e determinou-se o perfil de viscosidades (3 ensaios por amostra) no viscosímetro RVA (Rapid Visco Analyser), em suspensões de 15% sólidos (28g no total), com a taxa de aquecimento de 10°C/min e o programa tempo (min)/ temperatura (°C): 0:50, 2:50, 6.5:95, 11:95, 15:50, 25:50 [6,7,8]. Das curvas obtidas, registaram-se as viscosidades máxima, mínima e final (em cP), enfraquecimento ou *breakdown* (viscosidade máxima-viscosidade mínima), retrogradação ou *setback 1* (viscosidade final-viscosidade mínima), *setback 2* (viscosidade final-viscosidade máxima).

As propriedades reológicas da massa foram avaliadas pelo farinógrafo de Brabender (NP 3653:2000) adaptada a 40g de farinha, 44mL de água destilada (110% do peso da farinha), amassadura de 20 minutos em dois ensaios (água a 25°C e a 100°C), tendo-se registado o tempo de desenvolvimento da massa (Td em min), a consistência no Td (CTd) e a consistência no final do ensaio, aos 20min C20), ambas em UB (Unidades Brabender) [9].

A massa resultante do ensaio do farinógrafo, quer a água fria quer a água quente, foram sujeitas à avaliação da textura (compressão e pegajosidade) no Texturómetro TA-TX2i. Foi utilizado no ensaio TPA (Texture Profile Analysis) uma sonda cilíndrica de alumínio de 50mm de diâmetro, uma taxa de compressão da massa de 60%, seguida de um intervalo de 75s [10]. As propriedades mecânicas primárias foram avaliadas em dois ensaios, com e sem a utilização de uma película de filme sobre a superfície da massa. Através do perfil do TPA obtêm-se a dureza (g/Força), a adesividade (g/s), a coesividade, a fracturabilidade, a gomosidade e a elasticidade. Para o ensaio de pegajosidade da massa utilizou-se a célula Chen & Hosney e uma sonda cilíndrica com 25mm de diâmetro [10]. Foram realizadas 10 leituras para cada amostra para se obter o valor médio da pegajosidade (g/Força).

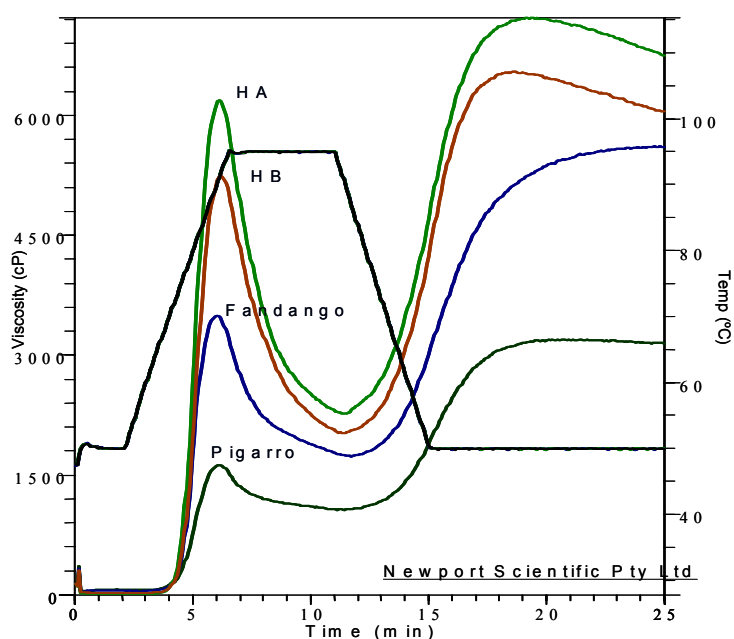
Realizaram-se análises da variância dos resultados obtidos pelo procedimento GLM do software SAS (1999) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectaram-se diferenças altamente significativas entre as quatro variedades analisadas no que respeita ao perfil de viscosidades (Figura 1). O perfil de viscosidades traduz os processos de gelatinização e retrogradação do amido que ocorrem durante o aquecimento/arrefecimento e agitação da suspensão da farinha na água.

As viscosidades máximas e finais das farinhas provenientes das variedades híbridas foram significativamente superiores às regionais. A farinha de milho da variedade Fandango (dent) apresenta valores superiores ao Pigarro (flint) concordando com os dados anteriormente obtidos [5, 11], relativos à colecção de germoplasma (n=105) onde os valores médios das viscosidades máximas e finais das linhas do tipo dent (2960 cP; 6802 cP) são significativamente superiores às do tipo flint (1803 cP; 4683 cP).

As diferenças notadas nas viscosidades devem-se à dureza do endosperma do grão que ao ser mais resistente nas variedades do tipo flint ocasiona farinhas com partículas de maior dimensão e dificuldade em gelatinizar relativamente às do tipo dent.



**Figura 1** – Perfil de viscosidades obtido com o RVA (Rapid Visco Analyser) da farinha de milho (ME) proveniente das variedades Fandango, Pigarro, HA-híbrido amarelo, HB- híbrido branco

Enquanto que o tipo de variedade influencia todos os parâmetros do perfil de viscosidade (Tabela 1), o tipo de moenda só influencia a viscosidade máxima, sendo os resultados médios das farinhas obtidas com o moinho de água (4140 cP) significativamente superiores aos do moinho eléctrico (3562 cP).

**Tabela 1** – Médias e comparação das médias pelo teste de Duncan de cada uma das variedades (n=6, 3 repetições x 2 moendas) e tipo de moenda (n=12, 3 repetições x 4 variedades) relativas aos resultados do perfil de viscosidades obtido pelo RVA

|             |                  | Viscosidade<br>Máxima<br>(cP) | Viscosidade<br>Mínima<br>(cP) | Viscosidade<br>Final<br>(cP) |
|-------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Variedades  | Fandango         | 2999 <sup>b</sup>             | 1391 <sup>c</sup>             | 4675 <sup>b</sup>            |
|             | Pigarro          | 1580 <sup>c</sup>             | 1088 <sup>d</sup>             | 3168 <sup>c</sup>            |
|             | HA               | 5342 <sup>a</sup>             | 2004 <sup>b</sup>             | 6344 <sup>a</sup>            |
|             | HB               | 5484 <sup>a</sup>             | 2340 <sup>a</sup>             | 6745 <sup>a</sup>            |
| Tipo moenda | Moinho água      | 4140 <sup>a</sup>             | 1764 <sup>a</sup>             | 5387 <sup>a</sup>            |
|             | Moinho eléctrico | 3562 <sup>b</sup>             | 1647 <sup>a</sup>             | 5078 <sup>a</sup>            |

Valores com letras iguais não são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

Na análise de variância ( $p < 0,05$ ) dos resultados dos parâmetros obtidos com o farinógrafo e texturómetro, as fontes de variação introduzidas foram o tipo de variedade, o tipo de moenda e a temperatura da água de amassadura. Os resultados obtidos, indicam que o tipo de variedade não influenciou os parâmetros analisados, a moenda afectou o parâmetro dureza do texturómetro, e a temperatura da água foi o principal factor para a variabilidade encontrada. Atingiram-se maiores consistências com menores tempos de desenvolvimento à temperatura de 100 °C (Tabela 2) comparativamente com a temperatura de 25°C. Registou-se a mesma influência nos parâmetros do texturómetro com excepção da coesividade.

**Tabela 2** – Médias e comparação das médias pelo teste de Duncan de cada uma das temperaturas da água (n=8, 4variedades x 2 moendas) relativas aos resultados do farinograma e do perfil de textura

| Temperatura água | Td<br>(min)      | CTd<br>(UB)        | C20<br>(UB)        | ADES<br>(g/s)     | COES              | PEG<br>(g/Força)  | ELAS              |
|------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 25 °C            | 9,4 <sup>a</sup> | 70,6 <sup>b</sup>  | 75,6 <sup>b</sup>  | 2267 <sup>b</sup> | 0,11 <sup>a</sup> | 18,5 <sup>b</sup> | 0,25 <sup>b</sup> |
| 100 °C           | 6,2 <sup>b</sup> | 158,8 <sup>a</sup> | 154,4 <sup>a</sup> | 6784 <sup>a</sup> | 0,08 <sup>b</sup> | 25,3 <sup>a</sup> | 3,2 <sup>a</sup>  |

Td- Tempo de desenvolvimento;CTd-Consistência no Td; C20-Consistência ao fim de 20 minutos; ADES- Adesividade, COES- Coesividade, PEG-Pegajosidade, ELAS- Elasticidade. Valores com letras iguais não são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

As diferenças de comportamento reológico detectado são devidas neste caso à gelatinização do amido que ocorreu devido à acção da temperatura, aspecto que é importante considerar quando as farinhas de milho se destinam ao fabrico de massas panares.

### Referências

- [1] – M.H. Gomez, J.K. Lee, M.C. McDonough, R.D. Waniska, L.W. Rooney - Corn starch changes during tortilla and tortilla chip processing. *Cereal Chemistry* **69**(1992):275-279.
- [2] – P.J. Whalen - Detection of differences in corn quality for extrusion processes by rapid visco analyser. *Cereal Foods World* **43**(1998):69-72.
- [3] – G.R. Kereliuk, F.W. Sosulski - Comparison of starch from flint corn with that from dent corn and potato. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **29**(1996):349-356.
- [4] – J.M. Rocha, A.M. Brás, J.J.B.L. Trigueiros, F.X. Malcata - *Pão de milho: caracterização do produto tradicional e melhoramento tecnológico*. Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, (2003), 75pp.
- [5] – C. Santos - *Relatório de actividades de bolsa de investigação*. Estação Agronómica Nacional, (2006), 6pp.
- [6] – H.D. Almeida-Dominguez, E.L. Suhendro, L.W. Rooney - Factors affecting rapid visco analyser curves for the determination of maize kernel hardness. *Journal of Cereal Science* **25**(1997):93-102.
- [7] – C. Collar - Significance of viscosity profile of pasted and gelled formulated wheat doughs on bread staling. *European Food Research and Technology* **216**(2003):505-513.
- [8] – C. Collar, E. Santos, C.M. Rosell - Significance of dietary fiber on the viscometric pattern of pasted and gelled flour fiber blends. *Cereal Chemistry* **83**(2006):370-376.
- [9] – C.M. Rosell, E. Santos, C. Collar - Mixing properties of fibre enriched wheat bread doughs: a response surface methodology study. *European Food Research and Technology* **223**(2006):333-340.
- [10] – C. Collar, E. Santos, C.M. Rosell - Assessment of the rheological profile of fibre-enriched bread doughs by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* **78**(2007):820-826.
- [11] – C. Brites (2006)- Melhoría da qualidade do pão de milho, no contexto de alimento funcional, Proc. Congreso Int Ciência y Tecnología Alimentos, Córdoba, Argentina, p. 33.

### Agradecimentos

Suporte financeiro dos projectos: POCI AGR/57994/2004- “Parâmetros da qualidade da “broa” de milho: Identificação dos genes que influenciam a aptidão tecnológica para panificação” e acção de cooperação GRICES – CSIC, Proc. 4.1.1. “Melhoria da qualidade do pão de milho, no contexto de alimento funcional”.

# FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA – INOCULAÇÃO DE CULTURAS DE ARRANQUE

Torres, M<sup>ª\*</sup>; Cabrita, M<sup>ª</sup>.J.; Palma, V.; Costa Freitas, A.M<sup>ª</sup>.

Departamento de Fitotecnia, Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas-ICAM, Universidade de Évora, Apt94 7002-554 Évora, Portugal  
Tel +351-266760800 Fax +351-266760828 e-mail: mariatorresevora.pt

**Palavras-chave:** fermentação maloláctica, bactérias lácticas, ácidos orgânicos, HPLC

**Resumo:** A fermentação maloláctica (FML) realizada por bactérias lácticas resulta na desacidificação do vinho, devido à conversão do ácido málico em ácido láctico. Decorrem também outros processos como a degradação do ácido cítrico em ácido acético e compostos em C4.

O objectivo deste trabalho é avaliar em termos químicos e microbiológicos, a evolução da FML, realizada espontaneamente ou com a inoculação de culturas de arranque num vinho tinto

Para tal realizou-se a FML nas seguintes condições: após a prensagem do vinho, este foi distribuído por 4 grupos de 3 depósitos de 20L. No primeiro a FML realizou-se espontaneamente (C), no segundo adicionaram-se 10g lisozima (L) a cada depósito (*Lysocid* da AEB, Brescia) para inibir a FML, no terceiro e quarto grupos foram adicionadas culturas de arranque comerciais - *Biolact Acclimatée* (B1) e *Biolact Acclimatée 4R* (AEB) (B2).

Seguiu-se a variação na concentração dos ácidos málico, láctico e cítrico por RP-HPLC, a partir do final da fermentação alcoólica

Para quantificação de bactérias lácticas fez-se a inoculação de vinho em placas MRS agar (Merck).

Nos grupos C, B1 e B2 observou-se um decréscimo lento da concentração de ácido málico até aos 14 dias e depois um consumo abrupto, não sendo o composto detectado ao fim de 23 dias. A formação de ácido láctico seguiu de forma inversa. A diminuição da concentração de ácido cítrico torna-se evidente apenas ao fim de 20 dias. No grupo L não houve consumo de ácido málico e cítrico, nem produção de ácido láctico.

A análise microbiológica revelou valores mais elevados de bactérias lácticas nos grupos B1 e B2. Nos grupos B1, B2 e C observou-se um decréscimo contínuo da população até ao 20º dia.

No grupo L a população bacteriana é a mais reduzida, não apresentando variações ao longo do ensaio.

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de vinificação consiste em dois passos principais: a fermentação alcoólica realizada por leveduras, seguida da fermentação maloláctica (FML) realizada por bactérias lácticas. A consequência mais evidente da FML consiste na redução da acidez total e num ligeiro aumento da acidez volátil. Estas modificações resultam principalmente do metabolismo do ácido málico e do ácido cítrico. O ácido málico é convertido em ácido láctico e o ácido cítrico é degradado maioritariamente em ácido acético e compostos em C4 como o diacetil, a acetoína e o 2,3 butanediol [1,2].

A acumulação de diacetil, acetoína, 2,3 butanediol e ácido acético no vinho depende da taxa da FML. Quando o processo é rápido a acumulação de ácido acético formado, a partir do ácido cítrico presente, é elevada e a formação de compostos em C4 é reduzida. Por outro lado, quando as bactérias se multiplicam mais lentamente é produzido menos ácido acético e maior quantidade de compostos em C4 [3].

Compreender e controlar os diferentes factores associados à gestão correcta da FML é de grande importância para os produtores de vinho, sendo a utilização de culturas de bactérias lácticas comerciais um meio disponível que é actualmente utilizado apenas de forma empírica durante a vinificação.

O objectivo deste trabalho é avaliar em termos químicos e microbiológicos, a evolução da FML, realizada espontaneamente ou com a inoculação de culturas de arranque.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Ensaio de vinificação**

Após a prensagem distribuiu-se o vinho por 4 grupos de 3 depósitos de 20L, identificados como C, L, B1 e B2.

No grupo C a FML realizou-se espontaneamente.

No grupo L inibiu-se a FML adicionando 10g lisozima (L) a cada depósito (*Lysocid* da AEB, Brescia)

Aos grupos B1 e B2 foram adicionadas respectivamente 1g das culturas de arranque comerciais *Biolact Acclimatée* e *Biolact Acclimatée 4R* (AEB), após a devida activação.

### **2.2 Determinação da concentração dos ácidos málico, láctico e cítrico**

A 5mL de vinho adicionaram-se 5 mL de  $H_3PO_4$  1N, 1 mL do vinho acidificado foi passado através de um SepPak C18 (300mg da Waters) activado, eluindo com  $H_3PO_4$   $5 \times 10^{-3}M$  e recolhendo o eluato para um balão volumétrico de 5mL.

1 mL do eluato foi filtrado com uma membrana de  $0,2\mu m$  (Supor® - 200 da GelmanSciences) e injectaram-se  $20\mu L$  no HPLC (HP1050).

Realizou-se a separação isocrática numa coluna Superspher® RP 18 ( $5\mu m$ , 250mm x 4,6mm i.d. Merck) com  $H_3PO_4$   $5 \times 10^{-3}M$  a um fluxo de 0,6mL/min. A detecção foi feita num detector de sistema de díodos (Agilent 1100) a 214nm.

Determinou-se a concentração dos ácidos málico, láctico e cítrico nas amostras de vinho a partir do método do padrão externo. As rectas de calibração foram construídas a partir de padrões em triplicado com as seguintes concentrações: ácido málico 4,00; 2,00; 0,80; 0,40 e 0,20 g/L, ácido láctico 1,99; 0,99; 0,40, 0,20 e 0,10g/L e ácido cítrico 1,02; 0,51; 0,20; 0,10 e 0,05g/L.

### **2.3 Determinação da acidez total e da acidez volátil**

Determinou-se a acidez total por titulação potenciométrica e acidez volátil por destilação no aparelho de Cazenave e titulação potenciométrica dos diferentes vinho após a FML

### **2.4 Quantificação de bactérias lácticas**

A cultura das amostras de vinho realizou-se em placa após sementeira em superfície de 0,1 ml de diferentes diluições no meio selectivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe – Oxoid) a pH 5,7. A incubação foi efectuada durante 72 horas a 30 °C, em condições de anaerobiose pelo que se utilizou uma jarra “Oxoid” com catalisador, “kit” gerador de gases e indicador de anaerobiose. A contagem das colónias foi referida ao mililitro de produto

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como está representado na Figura 1 observou-se nos grupos C, B1 e B2 um lento decréscimo da concentração de ácido málico até aos 14 dias, seguido de um consumo mais brusco, não sendo o composto detectado ao fim de 23 dias. A formação de ácido láctico seguiu de forma inversa, sendo observado um aumento na sua concentração apenas ao fim de 14 dias. A diminuição da concentração de ácido cítrico torna-se evidente apenas ao fim de 20 dias.

Aparentemente os principais processos que ocorrem durante a FML decorreram de forma semelhante nos grupos C, B1 e B2, ou seja, realizada por bactérias indígenas ou com a inoculação de ambas as bactérias comerciais.



No grupo L não houve consumo de ácido málico e cítrico, nem produção de ácido láctico. Foi então possível inibir a FML recorrendo à acção da lisozima sobre as paredes celulares bacterianas.

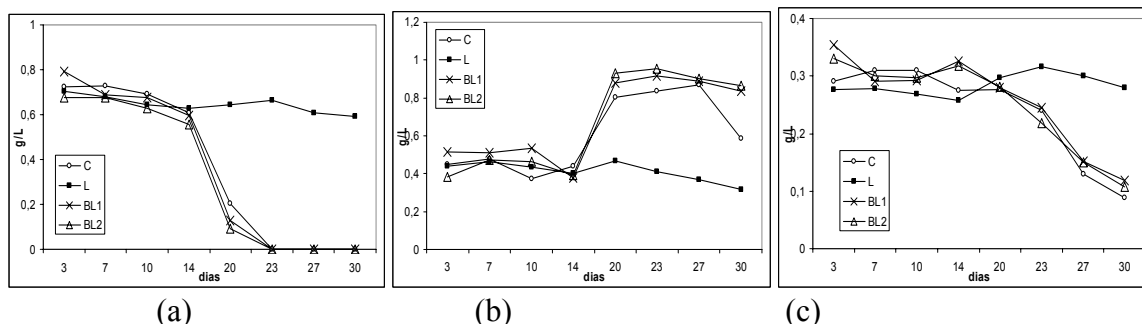


Figura 1 - Evolução da concentração de ácido málico (a), ácido láctico (b) e ácido cítrico ao longo da FML

Também os resultados da acidez total e da acidez volátil (Tabela 1) se revelam semelhantes nos ensaios C, B1 e B2 indicando que quanto à diminuição da acidez total devido à degradação do ácido málico e quanto ao aumento da acidez volátil devido à produção de ácido acético a FML decorreu de forma idêntica nos três grupos diferentes. Os valores obtidos para o grupo L, acidez total mais alta e acidez volátil mais reduzida, resultam da inibição da FML.

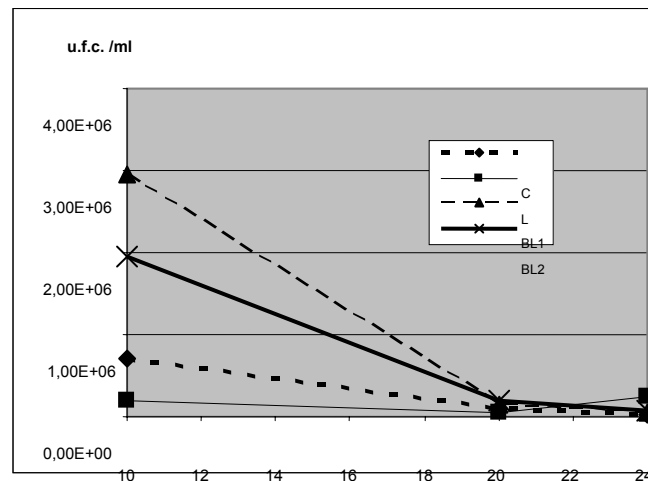
**Tabela 1:** Resultados da acidez total e da acidez volátil obtidos para C, L B1 e B2 após a FML

| Ensaio | Acidez total                         | Acidez Volátil                     |
|--------|--------------------------------------|------------------------------------|
|        | (ácido tartárico g/dm <sup>3</sup> ) | (ácido acético g/dm <sup>3</sup> ) |
| C      | 5,24                                 | 0,52                               |
| L      | 6,27                                 | 0,36                               |
| B1     | 5,30                                 | 0,56                               |
| B2     | 5,25                                 | 0,52                               |

A análise microbiológica (Figura 2) revelou valores mais elevados de bactérias lácticas nos grupos B1 e B2. Nos grupos B1, B2 e C observou-se um decréscimo contínuo da população até ao 20º dia.

No grupo L a população bacteriana é a mais reduzida, não apresentando variações ao longo do ensaio.

O decréscimo no número de bactérias coincide com o consumo de ácido málico. No entanto, a degradação de ácido cítrico ocorre quando o número de bactérias é já reduzido, indicando que outros microrganismos poderão também estar envolvidos na degradação do ácido cítrico em piruvato que, com a conversão em acetoína e 2,3 butanediol permite a reoxidação de NADH.



**Figura 2** - Evolução das bactérias lácticas (u.f.c./mL) ao longo da FML

Embora a inoculação de bactérias tenha permitido atingir um maior número de u.f.c./mL, os processos metabólicos da FML estudados decorrem da mesma forma com ou sem a inoculação de culturas comerciais.

Contudo além destes processos, estão também associadas à FML outras alterações mais subtis com consequência na fracção volátil [3,4] ou nos compostos fenólicos [5].

A inibição com sucesso da FML recorrendo ao lisozima revela-se um procedimento eficaz para o estudo destas alterações, podendo as diferentes culturas apresentar efeitos a este nível

## Referencias

- [1] Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A. and Bertrand, A. (2005) Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology* **22**, 569–575
- [2] Ugliano, M. and Moio L. (2005) Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 10134–10139
- [3] Lonvaud-Funel, A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 317–331
- [4] Torres, M.; Cabrita, M.J.; Costa Freitas, A.M. (2006) Controlling Wine Malolactic Fermentation: Fermentative Aroma Compounds, *29th International Symposium on Capillary Chromatography*, de 29 de Maio a 2 de Junho, Riva del Garda, Itália
- [5] Cabrita, M.J.; Torres, M.; Costa Freitas, A.M. (2006) Controlling Wine Malolactic Fermentation: Low Molecular Weight Phenolic Compounds, *29th International Symposium on Capillary Chromatography*, de 29 de Maio a 2 de Junho, Riva del Garda, Itália

# IMPACTE AMBIENTAL CAUSADO PELO DESPERDÍCIO DE ALIMENTOS (\*)

*Gonçalves, A.<sup>1</sup>; Silva, P.<sup>1</sup>; Madeira, P.<sup>1</sup>; Marreiros, S.<sup>1</sup> & Carvalho, F.<sup>2</sup>.*

Escola Superior Agrária de Beja, Área Departamental de Ciências do Ambiente  
Rua Pedro Soares, 7801-908 Beja  
Tel+351-284 314 300 Fax +351-284 388 207 e-mail: [mfcarvalho@esab.ipbeja.pt](mailto:mfcarvalho@esab.ipbeja.pt)

1 - Alunos/as do 1.º Ano do Curso de Engenharia do Ambiente da Escola Superior Agrária de Beja

2 - Docente da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, Área Departamental de Ciências do Ambiente

(\*) Disciplina de “Introdução aos Problemas Ambientais” do Curso de Engenharia do Ambiente, Ano Lectivo de 2005-06

**Palavras-chave:** Desperdício de alimentos; impacte ambiental; reduzir desperdícios.

## RESUMO

Quem desperdiça alimentos não é necessariamente rico. O povo americano (rico) e o povo brasileiro (pobre) desperdiçam muito e, em contrapartida o povo japonês (rico) não desperdiça.

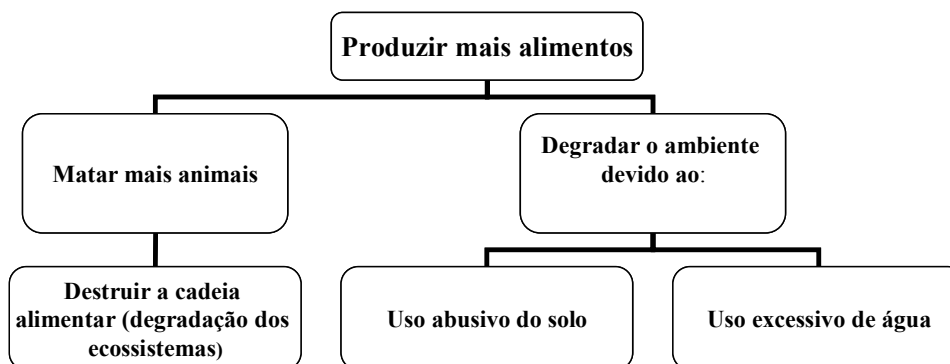
Os impactes ambientais resultantes do desperdício de alimentos são enormes: o aumento da produção de alimentos e conseqüente aumento do consumo de água, energia, embalagens e combustíveis, dão origem a uma ampliação desnecessária do volume de resíduos e degradação ambiental (devida ao uso abusivo do solo e da água e também devida a uma degradação dos ecossistemas).

Desperdiçar alimentos significa, ainda, usar indevidamente dinheiros públicos que poderiam ser utilizados em benefícios sociais.

Cada um de nós pode contribuir para diminuir os impactes ambientais provocados pelos desperdícios de alimentos, particularmente, os de natureza agro-industrial, através de medidas de protecção da natureza, bem como nos actos quotidianos.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os alimentos produzidos e não usados efectivamente na alimentação humana são uma má administração dos recursos naturais. As perdas de alimentos começam no local de produção e acabam quando são consumidos. Há um custo ambiental do qual ninguém se lembra: cada quilo de alimentos jogados fora implica a necessidade de produzir mais outro quilo para abastecer a população, ou seja, desperdiçando mais alimentos, temos que:



No Brasil, as perdas de produção agrícola – desde a produção até à mesa dos brasileiros - atinge os 30% ([http:// www.recife.pe.gov.br](http://www.recife.pe.gov.br)). Apesar da maioria dos estudos sobre desperdícios de alimentos (Engstrom e Kannyama, 2004), terem começado há algumas décadas atrás e, apenas centrados numa minoria de cozinhas, os resultados apontam para a necessidade da aplicação de políticas eficazes de combate ao desperdício, quer do ponto de vista ambiental, quer económico.

Engstrom e Kannyama (2004), no seu estudo levado a cabo na Suécia, Estocolmo, em quatro Instituições com serviço de refeições, concluíram que um quinto dos alimentos é desperdiçado. Os mesmos Autores concluíram que se desperdiça 11 a 13% do total de alimentos servida nos pratos. As perdas de alimentos, em Instituições com serviço de refeições, pode ter um valor económico significativo, uma vez que se está a desperdiçar alimentos correspondentes aos produzidos em 1,5% da área total cultivada na Suécia.

Estima-se que no Brasil sejam desperdiçados 39 milhões de quilos de alimentos, que dariam para alimentar, diariamente, 19 milhões de pessoas ([www.bancodealimentos.org.br](http://www.bancodealimentos.org.br)). Também, nos Estados Unidos da América, se verifica que as principais origens do desperdício de alimentos se centram no consumidor final (Heller e Keoleian, 2002).

Desta forma, estamos a utilizar mais solo arável desnecessariamente e contribuir para uma maior poluição do ar por pesticidas, NO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, bem como para a perda de matéria orgânica do solo (Stoate. *et al*, 2001). Não esqueçamos que é o solo que sustenta a vida terrestre: produção de biomassa, purificação da água (Lal, 2001).

As etapas da produção de alimentos na indústria alimentar (produção de alimentos, processamento, transporte, distribuição e venda) apresentam impactes ambientais, sejam eles derivados dos desperdícios na própria produção ou através dos efluentes gerados. Adicionalmente o seu desperdício representa uma perda de biomassa e nutrientes (Kroyer, 1995).

## **2 - DESENVOLVIMENTO DO TEMA**

### **2.1 - Razões Históricas para o Desperdício de Alimentos**

Nos países onde há abundância de espaço e abundância de recursos minerais, agrícola e outros de origem física, química e biológica, não existe uma preocupação de poupança desses recursos. Aqueles países que não sofreram efeitos da guerra em seus próprios territórios (nos tempos modernos), não sentiram a necessidade de se defrontar com uma economia de guerra, em grau muito forte, para a sustentação de seus povos e, também, para a reconstrução daquilo que foi destruído nos seus territórios, em termos de bens materiais. Dessa forma, o Japão e muitos países da Europa que passaram por guerras em seus territórios, têm uma consciência maior no combate ao desperdício, particularmente alimentar ([www.sitiodomoinho.com](http://www.sitiodomoinho.com)).

### **3.2 - Algumas medidas para combater o desperdício de alimentos:**

A Educação ambiental será um grande passo para que cada cidadão possa começar a dar o seu contributo no seu dia - a -dia, de modo a alterar os seus hábitos quotidianos e, contribuir, desse modo, para uma melhoria do ambiente.

### **2.2.1 - Abolir preconceitos**

- É só preciso ter coragem para enfrentar os tabus e costumes e partir para a adoção de medidas de aproveitamento total dos alimentos;
- Há muitas ervas de natureza forrageira, como por exemplo a serralha, que já foram utilizadas na alimentação e que hoje são consideradas pragas de pastos e jardins.

### **2.2.2 - Na preparação de refeições**

- Ao preparar alimentos em casa, prefira as porções menores;
- Ao preparar as refeições, evite desperdício: talos, folhas, sementes e cascas têm grande valor nutritivo e possibilitam variações no cardápio. Experimente receitas que aproveitem os alimentos ao máximo: das folhas da beterraba, da cenoura e de outros vegetais podem fazer-se bolinhos, tortas salgadas ou doces, sopas e caldos. Aproveite, também, os talos dos brócolos e couve-flor;
- Além de formar resíduo, desperdiçar alimentos significa também desperdiçar água (cerca de 70% da água disponível é usada na irrigação da lavoura) e poluir a atmosfera (existem estudos científicos que ligam a actividade agrícola ao aquecimento global do planeta);
- Para conservar os alimentos evite usar papel de alumínio ou filme plástico. Prefira produtos duráveis, como potes de plástico com vedação, tipo “Tupperware” (<http://www.akatu.org.br>).

Lembre-se que o destino dos restos dos alimentos são os aterros sanitários.

### **2.2.3 - No dia-a-dia de cada um**

- Procurar colocar no prato somente a quantidade que realmente irá comer;
- Planejar uma forma de reaproveitar os alimentos, caso haja sobra;
- Evitar guardar em casa grandes quantidades de alimentos, pois eles podem perder a validade e assim serão desperdiçados e colocados no lixo;
- Dar preferência a restaurantes que tenham sistema de atendimento que gerem menos desperdício - os sistemas de *buffet* são grandes desperdiçadores de alimentos;
- Nos restaurantes, evitar deixar alimentos no prato - se necessário pedir porções menores.
- Se colocar alimentos no lixo, pelo menos separe os alimentos em secos e molhados, para facilitar e incentivar a reciclagem.

### **2.2.4 - Nas Escolas**

Como o problema dos desperdícios de alimentos, a nível macroeconómico, é de difícil solução e, por envolver diversas variáveis, deve-se iniciar essa educação no ciclo básico das escolas, onde os alunos ainda não enraizaram totalmente os preconceitos e hábitos alimentares e são mais acessíveis a mudanças.

Além disso, irão transmitir o que aprenderam aos seus pais tornando-se, desta maneira, multiplicadores do conhecimento adquirido.

No entanto, essa orientação não deve ser unicamente retórica:

- Há necessidade que o Educando ponha em prática o que aprendeu, em aulas práticas de culinária alternativa, além de se promover aulas de degustação dos alimentos preparados;
- O Professor deve mostrar que há outros produtos vegetais alimentares e indicar quais os que podem ser encontrados nos quintais e hortas ou hortejos, que também servem de alimento.

### 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Num mundo, onde a população global é de 6 bilhões de pessoas e que tem aumentado a uma taxa de 1,3%, ou seja, de 73 milhões de pessoas por ano (Lal, 2001), desperdiçar alimentos pode ameaçar directamente a existência do ser vivo, particularmente a própria vida humana, bem como o ambiente onde vive. Portanto é imperativo implementar medidas urgentes de educação ambiental a diversos níveis de formação, para alterar os hábitos de desperdícios alimentares instalados no nosso quotidiano. Urge também implementar políticas de produção e consumo, que tenham por objectivo a erradicação desta problemática a nível mundial.

### 5 – BIBLIOGRAFIA

- Biswas, M. R., Biswas, A. K. “Environmental impacts of the world’s food production”. *Agriculture and Environment*. **1975**; 2(4): 291-309.
- Cristiane, R. “Aproveitamento total dos alimentos” [http://users.matrix.com.br/mariabene/reciclagem\\_de\\_alimentos.htm](http://users.matrix.com.br/mariabene/reciclagem_de_alimentos.htm). 1996; **acedido em 07.01.07.**
- Engstrom, R., Kanyama-Carlsson, A. (2004) “Food losses in food service institutions. Examples from Sweden”. *Food Policy*. **2004**; 29:203-213.
- Heller, M., Keoleian, A.G. “Assessing the sustainability of the US food System: a life cycle perspective”. *Agricultural Systems*. **2003**; 76:1007-1041.  
<http://www.akatu.org.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1065&sid=111>, **acedido em 04.01.07.**
- Kroyer, G.Th. “ Impact of Food Processing on the Environment – an Overview”. *Lebsn. Wiss u. Technol*. **1995**; 28: 547-552.
- Lal, R. “ Managing World soils for food security and environment quality”. *Advances in Agronomy*. **2001**: 74:155-192.
- Stoate, C. Boatman, N.D., Borralho, R.J., Carvalho, C.R. “Ecological Impacts of Arable Intensification in Europe”. *J. Environmental Management*. **2001**; 63: 337-365.  
[www.bancodealimentos.org.br](http://www.bancodealimentos.org.br) **acedido em 03 .01.07.**  
[www.recife.pe.gov.br/especiais/fomezero/projecto%20banco%20de%20alimentos.pdf](http://www.recife.pe.gov.br/especiais/fomezero/projecto%20banco%20de%20alimentos.pdf).

# IMPACTO DA DESCONTAMINAÇÃO PELO CALOR NA QUALIDADE DE CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA

*Alegria, C.<sup>1\*</sup>; Gonçalves, E.M.<sup>1</sup>; Pinheiro, J.<sup>1</sup>; Fernandes, I.<sup>1</sup>; Moldão-Martins, M.<sup>2</sup>, Abreu, M.<sup>1</sup>*

1. Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI, Estrada Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal.
2. Centro de Estudos Agro-Alimentares, ISA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal  
\* - Telf.: +351 21 7127100; Fax: +351 21 7127162; e-mail: carla.alegria@mail2.ineti.pt;

**Palavras-Chave:** Cenoura minimamente processada; Tratamento térmico; Hipoclorito de sódio; armazenamento.

**Resumo:** A operação de descontaminação com utilização de hipoclorito de sódio, realizada no âmbito da tecnologia de processamento mínimo de cenoura ripada (CMP) imediatamente após o corte dos tecidos, origina acentuadas perdas da qualidade em fresco. As alterações observadas, nomeadamente da cor e do sabor, devem-se em grande medida aos fenómenos de lixiviação / oxidação de compostos durante a imersão do produto nos banhos de tratamento, intensificados pelo aumento da área específica produzida pelo corte. A utilização de hipoclorito de sódio como agente de descontaminação é igualmente muito questionada, pelos fracos resultados na redução da carga microbiana inicial e pelos riscos químicos inerentes (consumidor e ambiente). A procura de soluções de descontaminação mais eficientes, com redução da dependência química e, simultaneamente, que envolvam um impacto mínimo na qualidade em fresco do produto constitui na actualidade uma importante área de investigação. O objectivo deste estudo foi avaliar a efectividade do tratamento térmico a 100°C\_45 s (TT\_CI) como operação de descontaminação alternativa à utilização do hipoclorito de sódio (HIPO\_CR), com alteração da localização de aplicação no diagrama tecnológico, na qualidade de CMP, ao longo do armazenamento a 5°C (0, 4, 7 e 10 dias). O controlo analítico incluiu a avaliação de parâmetros químicos (pH, teor de sólidos solúveis), bioquímicos (actividade da peroxidase) e microbiológicos (microrganismos a 30°C, bolores e leveduras e bactérias lácticas), bem como a avaliação sensorial da cor, aroma e apreciação global (painel sensorial). O TT\_CI revelou, comparativamente ao HIPO\_CR, uma maior eficiência na eliminação dos microrganismos contaminantes e na preservação das características sensoriais do produto em fresco, durante um período de 10 dias. Atendendo exclusivamente ao critério microbiológico (contagens < 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>), o TT\_CI permitiu um acréscimo de 3 dias ao período de vida útil do produto.

## 1. Introdução:

A cenoura ripada (*Daucus carota* L.) é um dos hortícolas minimamente processados (HMP) mais vulgarizados no mercado destes produtos. No entanto, o desenvolvimento microbiano durante o armazenamento é muito rápido [1], limitando, ao fim de poucos dias (4 a 6), o respectivo período de vida comercial. Por forma a garantir a manutenção da qualidade microbiológica de cenoura minimamente processada (CMP) por períodos de tempo mais alargados, é necessário desenvolver processos de descontaminação cuja eficiência seja superior à verificada com hipoclorito de sódio.

A descontaminação de CMP efectuada, regra geral, pela imersão do produto cortado em soluções refrigeradas de hipoclorito de sódio, nas concentrações de cloro livre de 50 a 200 ppm, revela-se insuficiente em termos da redução da carga microbiana inicial, acarretando igualmente elevadas perdas, por lixiviação de compostos (açúcares e pigmentos) com implicações negativas na qualidade sensorial (cor, sabor e aroma) do produto, no pós processamento. As referidas limitações da cloragem, acrescidas do risco químico associado quer para o consumidor como para o ambiente, impulsionam o desenvolvimento de tecnologias alternativas [2, 3]. Resultados de estudos efectuados em CMP demonstraram que a aplicação de calor (50°C) foi mais efectiva na redução microbiológica inicial face à

cloragem [4]. Por outro lado, a prevenção de acumulação de isocoumarina, evitando fenómenos de descoloração e o desenvolvimento de aromas indesejáveis [5, 6] foram outros benefícios importantes associados à aplicação de tratamentos térmicos (70° e 99°C).

Foi objectivo deste trabalho avaliar o impacto da aplicação de calor (100°C\_45 s) em cenoura inteira, como metodologia de descontaminação alternativa à utilização de hipoclorito de sódio no produto cortado, na qualidade microbiológica e físico-química de CMP durante 10 dias de armazenamento (5°C).

## 2. Material e Métodos

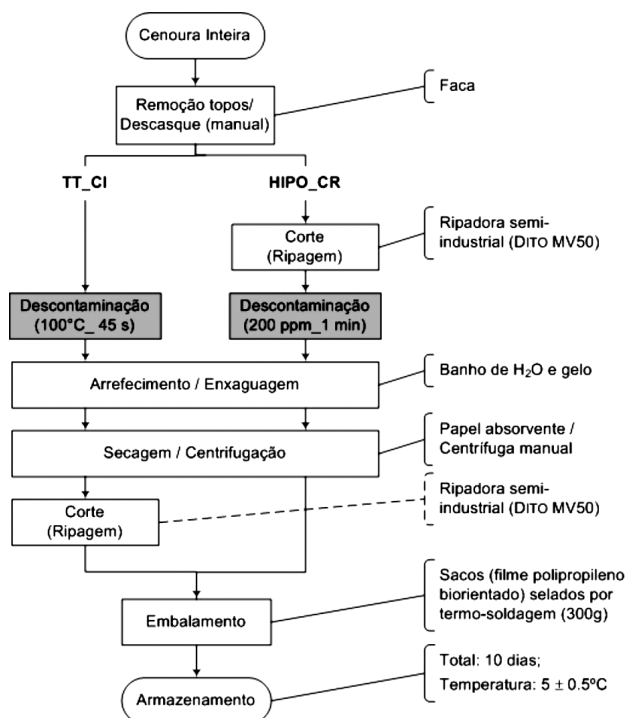
Foi utilizada cenoura *cv.* Nantes (25 kg) (comprimento médio 140-180 mm e diâmetro transversal 40 mm, livre de defeitos) para a execução das operações de processamento mínimo (fig. 1) das amostras tratadas e das amostras de cenoura ripada não descontaminada embalada (referência). As metodologias em estudo compreenderam a descontaminação com hipoclorito de sódio (200 ppm, 1 minuto) no produto cortado [HIPO\_CR] vs descontaminação por calor (100°C\_45 s) em cenoura inteira [TT\_CI]. Após o PM todas as amostras (300 g cada em triplicado) foram armazenadas em condições de refrigeração (5°C). A avaliação analítica foi efectuada nos dias 0, 4, 7 e 10 e compreendeu as seguintes determinações: contagem de microrganismos a 30°C (Micro.30°C) [7]; bolores e leveduras (B&L) [8]; bactérias

láticas [9]; pH (potenciómetro Crison Micro pH 2001); teor de sólidos solúveis (TSS) (refractómetro ATAGO DRA1) e actividade enzimática da peroxidase (POD) (método descrito por [10]). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, teste Tukey,  $p=0.05$ ) com recurso ao software STATISTICA v 6.1.

## 3. Resultados e Discussão

A partir da figura 2 a, foi possível constatar níveis de redução da carga de Micro. 30°C inicial, face ao valor registado na amostra referência (4.8 ciclos Log), de 2.1 ciclos Log e de 1.1 ciclos Log nas amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], respectivamente.

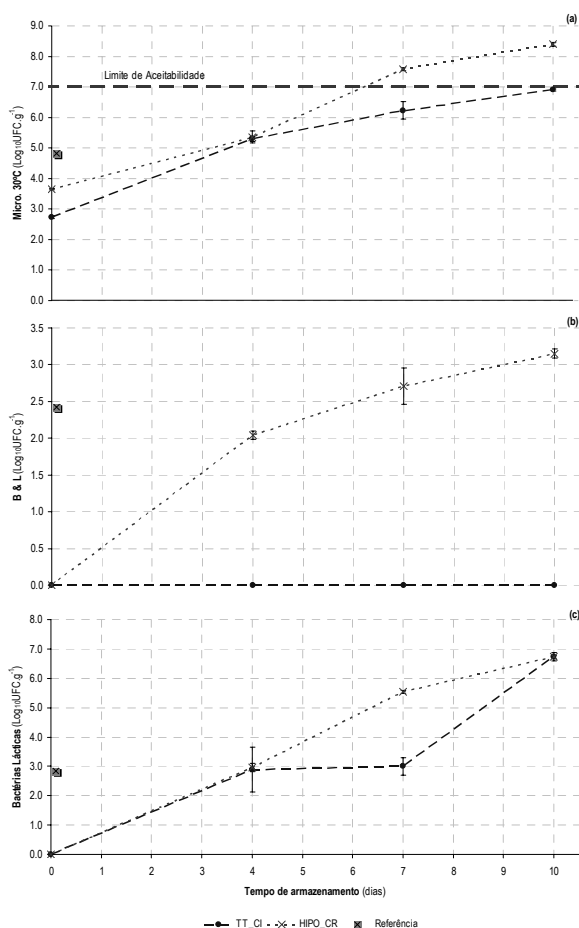
Até ao 4º dia não se registaram diferenças significativas ( $p>0.05$ ) na evolução de Micro. 30°C, para ambos os tipos de amostras. A partir desse dia, o desenvolvimento microbiológico nas amostras [TT\_CI], foi significativamente inferior, ao verificado nas [HIPO\_CR] (ca de 1 ciclo Log), registando estas últimas, contagens na ordem de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> ao 7º dia. Este nível de contaminação corresponde ao limite máximo utilizado na definição do termo de validade destes produtos, segundo a legislação espanhola [11]. As contagens de Micro. 30°C obtidas nas amostras [TT\_CI] até ao 10º dia de armazenamento (6.9 ciclos Log) foram sempre inferiores ao referido limite, evidenciando o tratamento térmico um controlo efectivo sobre o desenvolvimento deste conjunto de microrganismos. As amostras [TT\_CI] verificaram



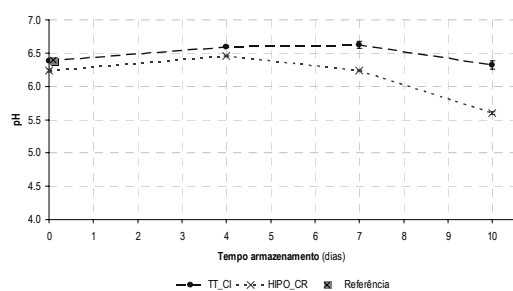
**Figura 1** Diagrama de processamento mínimo seguido para as duas metodologias em estudo.



contagens de B&L  $< 10\text{UFC.g}^{-1}$ , durante o período total de armazenamento. Contrariamente, nas amostras [HIPO\_CR] verificou-se o desenvolvimento de B&L, atingindo ao 10º dia, um quantitativo médio de 3 ciclos Log. Após o PM (dia 0), as duas amostras evidenciaram uma



**Figura 2** Evolução das contagens de Micro. 30°C (a), B&L (b) e bactérias lácticas (c) das amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], durante o armazenamento. As barras verticais representam o desvio padrão.



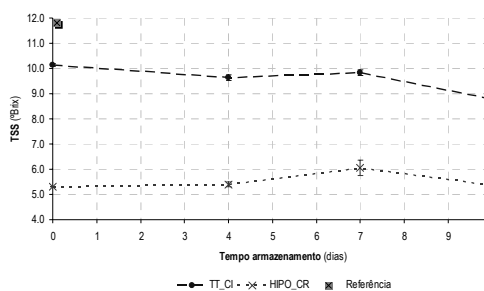
**Figura 3** Evolução do pH das amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], durante o armazenamento. As barras verticais representam o desvio padrão.

redução drástica da carga inicial de bactérias lácticas (2.8 ciclos Log registada na referência), embora se tenha verificado o desenvolvimento posterior. O quantitativo de bactérias lácticas verificado nos dois tipos de amostras, ao 4º dia de armazenamento, não apresenta diferenças significativas ( $p>0.05$ ). Ao 7º dia, verificou-se uma divergência de comportamentos, mantendo as amostras [TT\_CI] os resultados anteriores ( $p>0.05$ ) (3.0 ciclos Log), e tendo as amostras [HIPO\_CR] praticamente duplicado as respectivas contagens (5.5 ciclos Log). No final do armazenamento, as amostras apresentaram quantitativos da flora láctica semelhantes (*ca* de 7 ciclos Log).

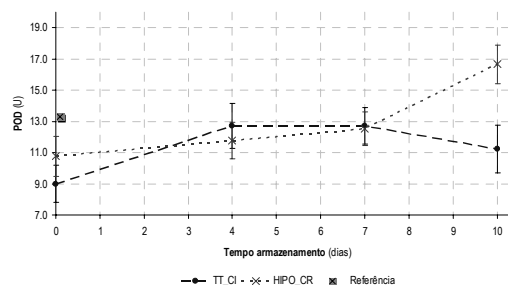
As variações de pH ( $p>0.05$ ) após o processamento registadas nos dois tipos de amostras (fig. 3) não excederam o valor de 0.3 unidades, relativamente ao valor determinado na referência (6.4). Durante o armazenamento as amostras [TT\_CI] mantiveram o seu pH próximo do valor inicial, observando as amostras [HIPO\_CR], uma descida acentuada ( $p<0.05$ ) do 7º para o 10º dia (de 6.8 para 5.2).

Após o PM, as amostras revelaram ambas uma descida significativa ( $p<0.05$ ) dos valores de TSS (fig. 3) relativamente à referência (11.8ºBrix), sendo nas amostras [HIPO\_CR], cerca de três vezes superior à verificada nas amostras [TT\_CI]. Estes resultados demonstram a importância do tratamento ser aplicado em inteiro como forma de reduzir a intensidade dos fenómenos de lixiviação, consequente da menor área dos tecidos cortados em contacto com as soluções de tratamento.

Durante o armazenamento verificou-se a manutenção dos quantitativos iniciais ( $p>0.05$ ) de TSS (fig.4), observados nos dois tipos de amostras



**Figura 4** Evolução do TSS das amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], durante o armazenamento. As barras verticais representam o desvio padrão.



**Figura 5** Evolução da actividade da POD das amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], durante o armazenamento. As barras verticais representam o desvio padrão.

No dia 0, as amostras, apresentaram níveis de redução da actividade da POD significativos ( $p < 0.05$ ) face à referência (13.3 U) (fig.5), da ordem de 33% e 19%, para as amostras [TT\_CI] e [HIPO\_CR], respectivamente. No armazenamento, exclusivamente as amostras [HIPO\_CR], registaram uma aumento gradual da actividade da POD significativo ( $p < 0,05$ ) do 7º para o 10º dia (16.65 U).

#### 4. Conclusões

A aplicação de calor (100°C-45 s) em cenoura inteira (TT\_CI) vs. cloragem no produto cortado (HIPO\_CR) permitiu prolongar a estabilidade microbiológica, química e bioquímica por um período de pelo menos 3 dias. A estabilidade química e bioquímica, demonstrada na metodologia de descontaminação por calor traduz uma maior retenção das características sensoriais em fresco.

#### Referências

- [1] R.D. Hagenmaier, R.A. Baker – *Microbial population of shredded carrot in modified atmosphere packaging as related to irradiation treatment* – Journal of Food Science, **63**(1) (1998) 162.
- [2] A. Cena – *Ozone: Keep it fresh for food processing* – Water Conditioning Purification. Sept (1998) 112.
- [3] Liangji Xu – *Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables* - Food Technology, **53**(10) (1999) 58.
- [4] R.G. Klaiber, S. Baur, G. Wolf, W.P. Hammes, R. Carle, R – *Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination* - Innovative Food Science and Emerging Technologies, **6** (2005) 351.
- [5] H.R. Bolin, C.C. Huxsoll – *Control of minimally processed carrot (Daucus carota) surface discoloration caused by abrasion peeling* – Journal of Food Science, **56** (2) (1991) 416.
- [6] L.R. Howard, L.E. Griffin, Y. Lee – *Steam treatment of minimally processed carrots sticks to control surface discoloration* – Journal of Food Science, **59** (2) (1994) 356.
- [7] Norma EN ISO 4833: 2003 – *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C.*
- [8] NP 3277-1: 1987 – *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C.*
- [9] Norma ISO 15214: 1998 – *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 °C.*
- [10] V. Bifani, V., J. Inostroza, M.J. Cabezas, M. Ihl – *Determinación de parámetros cinéticos de peroxidasa y clorofila a en judías verdes (Phaseolus vulgaris cv. Win) y estabilidad del producto congelado* – Revista Afinidad de Enero – Tomo LIX. **497** (2002) 57.
- [11] REAL DECRETO 3484/2000, do 29 de Dezembro, polo que se establecen as normas de hixiene para a elaboración, distribución e comercio de comidas preparadas. («BOE» 11, do 12-1-2001.), pp. 1435 – 1441.

# INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA NA QUALIDADE DE *Pleurotus ostreatus*

<sup>1</sup>Sapata, M. M\*.; <sup>1</sup>Ramos, A. C.; <sup>1</sup>Ferreira, A.; <sup>1</sup>Andrada, L.; <sup>1</sup>Candeias, M.; <sup>2</sup>Leitão, A. E.;  
<sup>1</sup>Vasconcellos, F.; <sup>1</sup>Gomes, M. L.

<sup>1</sup>INIAP – Estação Agronómica Nacional, Departamento de Tecnologia dos Produtos Agrários  
Q.<sup>ta</sup> do Marquês, 2784-505 Oeiras,

Tel. +351-214 403 500 Fax. +351- 214 413 208 e-mail: ean- tecnologia@clix.pt

<sup>2</sup>IICT – Departamento de Ciências Naturais

Apartado 3014, 1301-901 Lisboa

Tel. +351- 213 617 247 Fax +351 – 213 617 248 e-mail: cestt@iict.pt

**Palavras-chave:** cogumelos, embalagem, atmosfera modificada, qualidade, estabilidade

**Resumo:** A conservação de cogumelos frescos reveste-se de alguma complexidade, uma vez que se tratam de alimentos altamente perecíveis, com tempo de vida útil muito limitado, pois mantêm a sua actividade metabólica, mesmo após o processamento, devido à elevada taxa respiratória. No entanto, estes fenómenos podem ser minimizados através da utilização combinada da embalagem em atmosfera modificada com temperaturas de refrigeração, sem prejuízo da caracterização como “produto fresco”. Este método apresenta boas perspectivas, no que se refere à manutenção da composição, da textura e dos sabores e aromas originais do produto. O objectivo deste trabalho foi avaliar o tempo de vida útil de cogumelos *Pleurotus ostreatus*, conservados em filmes poliméricos de diferentes permeabilidades, com atmosfera modificada passiva e temperatura de refrigeração constante de 4°C. O controlo da estabilidade dos cogumelos foi determinado recorrendo a parâmetros definidores de qualidade: fisiológicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais. Pela análise dos resultados concluiu-se que os filmes de embalagem Cryovac PE 65S e Cryovac PD 961, conduziram a uma boa estabilidade e apresentação do *P. ostreatus*, com um tempo de vida útil mais alargado. Este estudo pretende ser mais um contributo para a melhoria do conhecimento do comportamento destes novos produtos minimamente processados, de modo a aumentar a sua competitividade no sector industrial.

## 1. INTRODUÇÃO

Actualmente existe uma preferência cada vez maior por alimentos frescos pouco processados e facilmente disponíveis no mercado. Os cogumelos frescos pertencem ao grupo de alimentos vivos altamente perecíveis (Rajarathanam *et al.*, 1983), com tempo de vida útil muito limitado, 4 a 5 dias (Hong *et al.*, 1986). Tal facto deve-se à elevada taxa de respiração, cerca de 500mg CO<sub>2</sub>/kg de massa fresca, à temperatura ambiente (Burton e Twyning, 1989), à produção de etileno (Kader, 1992) e também por não apresentarem qualquer barreira à perda de água ou deterioração bacteriana. Os principais sinais de alteração manifestados são devidos à desidratação, com perda de rigidez dos tecidos, ao escurecimento enzimático e/ou a lesões bacterianas (Choi e Kim, 2003). A conservação de cogumelos frescos tem levantado alguns problemas com o aparecimento, nos circuitos de distribuição, de certas alterações, como perda de humidade, de firmeza e de alterações no sabor e no aroma, o que conduz à diminuição da qualidade (Gormley, 1975). Daí a necessidade do desenvolvimento de tecnologias que possam aumentar o tempo de vida útil, reduzindo a perda económica e permitindo aos consumidores adquirir um produto mais fresco e disponível (Hong *et al.*, 1986). Assim, efectuou-se o estudo do controlo do metabolismo activo dos cogumelos *P. ostreatus*, conservados em filmes poliméricos de diferentes permeabilidades, com atmosfera modificada passiva, a 4°C, de modo a aumentar o tempo de vida útil do produto, durante a conservação e distribuição.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os cogumelos *P. ostreatus* produzidos nas instalações piloto do DTPA, foram seleccionados por tamanho e aparência, de forma a minimizar a variabilidade biológica. Após higienização, foram colocados (cerca de 120g) em cuvetes B-12 H47 da Ovarpack (PS-EVOH-PE, de 230x144x47 mm, espessura 550 $\mu$ m) que continham no seu interior absorvedores de humidade MP-Ovarpack (12x18 cm). Estas foram seladas com filmes de diferentes permeabilidades (Tabela 1) numa termoseladora MGM SAV VUOTO GAS.

**Tabela 1** - Características dos filmes de embalagem

| Código | Plástico Polietileno                 | Espessura ( $\mu$ m) | O <sub>2</sub> Permeabilidade (mL/m <sup>2</sup> .24h.atm) | CO <sub>2</sub> Permeabilidade (mL/m <sup>2</sup> .24h.atm) | Denominação comercial              |
|--------|--------------------------------------|----------------------|--|---|------------------------------------|
| A      | Baixa densidade                      | 10                   | $\approx$ 9550 <sup>1</sup>                                | $\approx$ 28000   | Freshmate film Vileda <sup>1</sup> |
| B      | Baixa densidade                      | 90                   | 2250   | 8000  | PE - 52 LV Amcor <sup>2</sup>      |
| C      | Baixa densidade e vinilideno clorado | 65                   | 3000-4000  | 11000-15000   | PE65S Cryovac                      |
| D      | Baixa densidade                      | 31                   | 6000-8000  | 19000-22000   | PD-961 Cryovac                     |

<sup>1</sup>Valores estimados com base em especificações do filme PE (*in*: tabela do catálogo da Amcor-Flexibles)

<sup>2</sup>Filme microperfurado para o embalamento deste tipo de produto – 1 microperfuração/14 cm<sup>2</sup> (responsabilidade do fabricante)

A mistura gasosa utilizada foi ar normal - atmosfera modificada passiva. As embalagens foram mantidas em câmara de refrigeração Radiber, S.A., regulada à temperatura constante de 4°C. A amostragem, em duplicado, foi realizada para as análises fisiológicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, nos tempos 0, 2, 4, 7, 9 e 11 dias.

Na avaliação da estabilidade foi determinado: *Composição da atmosfera das embalagens* - analisador de gases PBI Dansensor, Checkmate 9900; *teor de sólidos solúveis totais (°Brix)* - refractómetro digital ATAGO PR-1; *pH* - potenciómetro Crisonmicro pH2002; *perda de massa* - balança de precisão Precisa 400; *água retida no absorvedor* - diferença de massa entre o absorvedor seco e húmido, relativamente à massa de cogumelo fresco; *textura* - texturómetro Stable Microsystems TA-Hdi, munido com célula de carga de 50N, através de um ensaio de punção, com sonda inox P6 ( $\varnothing$ 6mm), à temperatura de 20°C; *cor* - colorímetro Minolta Chroma Meter 200b; *exsudato* - quantidade de líquido libertado por aproximadamente 4g de cogumelo, prensado com peso de 10kg (Salles Torres), durante 10 segundos. O controlo microbiológico, com os resultados expressos em log UFC/g constou de: contagens da flora aeróbia mesófila total (Plate Count Agar, 30°C, 48 horas), fungos e leveduras (Rose Bengal Chloramphenicol, 25°C, 5 dias), coliformes totais (Violet Red Bile Lactose Agar, 30°C, 48 horas), psicrotróficos (Plate Count Agar, 4°C, 10 dias), *Pseudomonas* (*Pseudomonas* Agar Base, 30°C, 48 horas) e formas esporuladas (Plate Count Agar, 30°C, 48 horas). Os dados foram tratados estatisticamente recorrendo ao programa Statistical V.6, por Análise de Componentes Principais (ACP) e por Análise Factorial Discriminante (AFD).

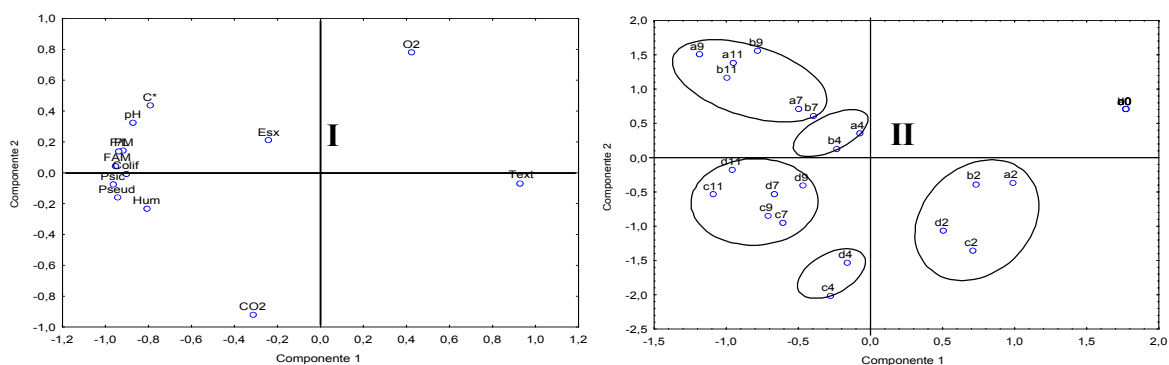
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras embaladas nos filmes A e B, apresentaram comportamento idêntico, típico de um produto submetido a atmosfera modificada activa e elevada permeabilidade aos gases. Nestas embalagens verificou-se ligeira diminuição no teor de O<sub>2</sub> do primeiro para o segundo dia, a partir do qual, se manteve constante, até ao final da conservação, significando que o equilíbrio foi atingido a partir do segundo dia. Quanto ao teor de CO<sub>2</sub> verificou-se ligeiro aumento no segundo dia, declinando a partir daí, para valores constantes. No caso das amostras embaladas

com os filmes C e D, o comportamento foi o de uma atmosfera modificada passiva, com teores de O<sub>2</sub> mais baixos e de CO<sub>2</sub> superiores, devido à conjugação das características dos filmes com a actividade respiratória do produto. Assim, verificou-se que o ponto de equilíbrio nas amostras embaladas com o filme C foi atingido entre o segundo e o terceiro dia, enquanto que no filme D foi atingido no terceiro. Quanto à evolução do °Brix, para todos os tipos de filmes, notou-se um ligeiro aumento, passando de 0,33 para 0,60. No exsudato, humidade e pH também não se verificaram quaisquer variações notórias, com os valores de exsudato de cerca de 50%, a humidade com valores de 96% e pH de cerca de 6,25 para 7,49. No que se refere à perda de massa e água libertada (absorvedor) pelos cogumelos, nos vários tipos de filmes, observou-se existir uma relação directa entre a perda de massa (3,62% a 14,25%), e a água recolhida no absorvedor (3,09% a 12%). Parte da água libertada pelos cogumelos ficou condensada nas paredes da embalagem ou do filme envolvente, daí a diferença verificada entre a perda de massa dos cogumelos e o aumento de massa do absorvedor. Para todos os filmes verificou-se uma diminuição da textura de cerca de 3,68N para 1,90N (48,4%), valores relacionados com a perda de firmeza observada a nível visual. Os valores de luminosidade aumentaram de 48,59 para 51,85, indicando que os cogumelos tornaram-se mais claros; os da saturação passaram de 11,21 para 17,53 evidenciando uma cor mais brilhante; a coloração, não apresentou grande variação, (77,22 a 78,28), em que os cogumelos apresentaram-se com uma cor mais próxima do tom amarelo ou castanho claro e pouco definida. Na evolução da carga microbiana, independentemente do tipo de filme, na flora aeróbia mesófila total verificou-se um aumento de cerca de dois ciclos logarítmicos (6,806 para cerca de 8,975 log UFC/g), nas *Pseudomonas* um aumento de quatro ciclos (de 4,097 para cerca de 8,546 log UFC/g), nos fungos e leveduras um aumento de dois ciclos, com uma evolução de 6,602 para cerca de 8,762 log UFC/g), nos psicrotróficos um aumento de cerca de dois ciclos (6,322 para cerca de 8,880 log UFC/g), nas formas esporuladas um aumento de um ciclo para a embalagem A (2,653 para 3,204 log UFC/g), três ciclos para as embalagens B e C (2,653 para cerca de 5,620 log UFC/g) e dois ciclos para a embalagem D (2,653 para 4,064 log UFC/g), nos coliformes totais um aumento de três ciclos evoluindo de 5,531 para cerca de 8,515 log UFC/g).

Por análise de componentes principais verificou-se que as duas primeiras componentes, explicam 80,09% da variância total (Figura 1-I). As variáveis perda de massa, textura, pH, humidade, flora aeróbia mesófila total, *Pseudomonas*, fungos/leveduras, psicrotróficos, coliformes e saturação encontram-se fortemente ligadas à primeira componente (contribuição de 65,28%) explicando a influência que estes parâmetros tiveram na evolução da alteração dos cogumelos, ao longo da conservação. Observa-se ainda uma forte ligação entre a componente microbiológica, que se apresenta com sinal contrário ao da textura e ao do O<sub>2</sub>. Este fenómeno deve-se ao facto de a alteração microbiológica, em presença de O<sub>2</sub>, comprometer a textura dos cogumelos. Verificou-se também, e como seria de esperar, a posição oposta entre os teores de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub>, justificando a segunda componente (contribuição de 14,81 %). Pela análise factorial discriminante (Figura 1-II), pode observar-se a influência das diferentes permeabilidades dos filmes na conservação dos cogumelos.

Os filmes estudados apresentaram, no segundo dia, um comportamento semelhante, tendo divergido em sentidos opostos, a partir do quarto dia. Este comportamento está relacionado com os níveis de O<sub>2</sub>, no caso dos filmes A e B e com os de CO<sub>2</sub> nos filmes C e D. As embalagens do sétimo ao décimo primeiro dias encontram-se muito próximas duas a duas, evidenciando um estado de conservação idêntico, até ao nono dia. Contudo, dada a menor concentração de O<sub>2</sub> no interior das embalagens C e D parece serem estas as mais convenientes



**Figura 1**

- (I) Análise de Componentes Principais: O<sub>2</sub>- Oxigênio; CO<sub>2</sub> - Dióxido carbono; PM - Perda massa; Text - Textura; pH ; Exs - Exsudato; C\* - Saturação; Hum - Humidade; FAM - Flora aeróbia mesófila; Pseud - *Pseudomonas*; Psic - Psicrotrofos; Colif - Coliformes; F/L - Fungos e Leveduras.  
 (II) Análise Factorial Discriminante: **a** - filme Vileda Freshmate film; **b** – filme 52 LV Amcor; **c** - Cryovac PE65S; **d** – Cryovac PD-961

para uma melhor conservação da estabilidade do produto. Durante o período de conservação foi realizada uma análise sensorial, em termos de avaliação da qualidade de mercado, tendo sido observadas modificações na cor, firmeza e desenvolvimento de aromas e de odores desagradáveis. Nas embalagens A e B as alterações manifestaram-se depois do sétimo dia de conservação, relativamente às embalagens C e D. A partir do nono dia foi observada uma maior frequência de aparecimento de embalagens alteradas, com perda de firmeza e desenvolvimento de odores desagradáveis. Os cogumelos *P. ostreatus* embalados com filme Vileda e Amcor apresentaram, na generalidade, uma degradação mais precoce, relativamente aos embalados com os filmes da Cryovac PE 65S e Cryovac PD 961. Assim, pode concluir-se que, a 4°C e aplicação de atmosfera modificada passiva, os filmes de embalagem Cryovac PE 65S e Cryovac PD 961, foram os mais eficazes na manutenção da qualidade e estabilidade dos cogumelos, permitindo uma “shelf life” de nove dias.

## Referências

- [1] - S. Rajarathman, Z. Bano, M. V. Patwardhan - Post-harvest physiology and storage of the white oyster mushroom *Pleurotus flabellatus*. J. Food Technol. **18** (1983) 153-162
- [2] - J. S. Hong, J. Y. Lee, Y. H. Kim, M. K. Kim – Studies on the volatile aroma components of *Pleurotus ostreatus*. Korean J. Mycol. **14** (1986) 31-36
- [3] - K. S. Burton, R. I. Twynning - Extending mushroom storage-life by combining modified atmosphere packaging and cooling. Acta Hort. **258** (1989) 565-571
- [4] - A. Kader - Modified atmospheres during transport and storage. 85-92 in: A.A. Kader (Ed.) *Postharvest technology of horticultural crops*, Univ. Calif. DANR, Publ.3311, Oakland (CA), (1992)
- [5] - M. H. Choi, G. H. Kim - Quality changes in *Pleurotus ostreatus* during modified atmosphere storage as affected by temperatures and packaging material. Acta Hort. **628** (2003) 357-362
- [6] - R. Gormley - Chill storage of mushrooms. J. Sci. Food Agric. **26** (1975) 401-411

## Agradecimentos

INIAP – Proj. PIDDAC nº 122/05: “Aumento do tempo de vida útil de cogumelos frescos do género *Pleurotus* embalados em atmosfera modificada”

# INFLUÊNCIA DA TORRA DE AVELÃS NA SUA COMPOSIÇÃO EM VITAMINA E

*Amaral, J.S.<sup>1,2,\*</sup>, Casal, S.<sup>3</sup>, Seabra, R.<sup>1</sup>, Oliveira, M.B.P.P.<sup>3</sup>*

REQUIMTE, <sup>1</sup> Serviço de Farmacognosia e <sup>3</sup> Serviço de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

<sup>2</sup> Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Qta de Sta Apolónia, ap. 134, 5301-857 Bragança, Portugal.

Tel +351-273 303 138 Fax +351-284 388 207 e-mail: [jamaral@ipb.pt](mailto:jamaral@ipb.pt)

**Palavras-chave:** vitamina E, avelã, torra, HPLC/DAD/FL

**Resumo:** Neste trabalho avaliou-se o efeito da torra da avelã (*Corylus avellana* L.) na sua composição em tocoferóis e tocotrienóis. Para tal, procedeu-se à quantificação dos diferentes vitâmeros em avelãs submetidas a diversas torras, compreendendo diferentes temperaturas (125, 145, 165 e 185 e 200 °C) e tempos de exposição (5, 15 e 30 min). As amostras foram analisadas utilizando-se uma metodologia de HPLC/DAD/FL previamente validada. Apesar de se verificar uma tendência de perdas crescentes com os aumentos de temperatura e tempo de torra, o decréscimo máximo do teor total comparativamente à amostra crua foi de 9,2%, tendo-se observado comportamentos distintos por parte dos diversos vitâmeros presentes na avelã.

## 1. INTRODUÇÃO

A avelã é um fruto seco consumido à escala mundial representando um produto de grande importância económica com produção superior a 700 000 toneladas no ano 2005 (FAO, 2006). A avelã é principalmente utilizada como ingrediente em diversos produtos tais como chocolates, bolos, cereais, gelados e cremes para barrar. Apenas uma pequena parte (8 a 10%) do total de avelãs produzidas mundialmente é consumida fresca sendo a maioria utilizada após torrefacção [1]. A torra é um processo geralmente realizado com o principal objectivo de modificar as características sensoriais do alimento, sendo estas modificações maioritariamente determinadas pela sua composição química (teores em água, gordura, proteína e hidratos de carbono), mas também pela presença de oxigénio e pelas temperaturas e tempos de torra utilizados [2]. Ao mesmo tempo, outros objectivos como a diminuição da humidade, a destruição de microrganismos e a inactivação de determinadas enzimas é também alcançada, contribuindo para a preservação e segurança do alimento.

O processamento térmico de alimentos é frequentemente associado à perda ou à diminuição de actividade de determinados compostos bioactivos. Entre outros compostos potencialmente benéficos, a avelã contém tocoferóis e tocotrienóis, geralmente referidos de uma forma global como vitamina E. No organismo, estes compostos funcionam como antioxidantes fisiológicos, protegendo compostos potencialmente oxidáveis como certas vitaminas e ácidos gordos insaturados.

Para estudar a influência do processamento térmico, procedeu-se à quantificação dos diferentes vitâmeros na amostra crua e após submissão a diferentes temperaturas e tempos de torra, utilizando uma metodologia de HPLC/DAD/FL previamente validada [3].

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Uma amostra de aproximadamente 3 kg de avelãs sem casca, retirada aleatoriamente de um lote de 50 kg, foi fornecida pela indústria transformadora Transagri Lda. (Mangualde, Portugal). As condições preferencialmente utilizadas na torra de avelã a nível industrial (145 °C, 15 min) foram reproduzidas à escala laboratorial. Para além destas condições, foram igualmente testadas as seguintes: 125 °C, 15 min; 125 °C, 30 min; 165 °C, 15 min; 165 °C, 30 min; 185 °C, 15 min e 200 °C, 5 min. As diversas torras foram realizadas numa estufa de ar forçado (WTC, Tuttlinger, Germany).

### 2.2 Reagentes e padrões

Preparou-se uma mistura padrão contendo os 8 vitâmeros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis e tocotrienóis, Calbiochem, La Jolla, USA) em proporções relativas similares às existentes na matriz em estudo. Como padrão interno utilizou-se uma solução de tocol (Matreya Inc., PA, USA) com concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$  em *n*-hexano. Como anti-oxidante, utilizou-se uma solução de butilhidroxitolueno (Aldrich, Madrid, Espanha) preparada em *n*-hexano com concentração de 10 mg/ml. Todas as soluções foram preparadas numa sala escura com luz vermelha.

### 2.3 Processo extractivo

Uma amostra rigorosamente pesada (aproximadamente 300 mg) de miolo de avelã moído foi colocada num tubo de vidro com rolha (Supelco, Bellefonte, PA, USA) e homogeneizado em vórtex com 2 ml de etanol, durante 1 min. Subsequentemente, adicionou-se *n*-hexano (4 ml), homogeneizou-se durante 1 min, adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio (2 ml) e homogeneizou-se novamente durante 1 min. Após centrifugação (2 min, 5000 g) removeu-se cuidadosamente a fase orgânica para outro tubo de vidro. A amostra foi re-extraída duas vezes com *n*-hexano (4 ml). Os extractos orgânicos foram reunidos no mesmo tubo de vidro e evaporados à secura em corrente de azoto e à temperatura ambiente, utilizando um módulo Reacti-Therm (Pierce, Rockford, IL, USA). O resíduo foi transferido com 1,5 ml de *n*-hexano para um tubo de microcentrífuga e desidratado com sulfato de sódio anidro. O extracto foi centrifugado (20s, 10000 g), transferido para um frasco escuro e injectado no sistema de HPLC.

### 2.4 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas num cromatógrafo Jasco (Japão), equipado com uma bomba PU-980, um injector automático AS-950 com um loop de 10  $\mu\text{l}$ , um detector de díodos e um detector de fluorescência FP-920. Os dados obtidos foram analisados através do software Borwin-PDA Controller (JMBS, França). A separação cromatográfica dos compostos realizou-se à temperatura ambiente, utilizando uma coluna de fase normal Inertsil 5 SI (250 x 3 mm; Varian, Middelburg, Netherlands). Como fase móvel, utilizou-se uma mistura *n*-hexane/dioxano (95,5:4,5, v/v), eluindo com um fluxo de 0,7 ml/min num programa isocrático. O efluente foi monitorizado com um detector de díodos ligado em série com um detector de fluorescência ( $\lambda$  excitação = 290 nm;  $\lambda$  emissão = 330nm). Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões (comparação de espectros UV e tempos de retenção). A quantificação dos compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras estudadas, foram detectados e quantificados sete compostos:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis e  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocotrienóis. A Tabela 1 mostra a composição de cada uma das amostras estudadas.

**Tabela 1** – Composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/ kg avelã, peso seco) de avelã crua e sujeita a diferentes torras.

| Amostra       | Tocoferóis e Tocotrienóis |                 |                 |                 |                 |                 |                 | Total |
|---------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
|               | $\alpha$ -T               | $\alpha$ -TTR   | $\beta$ -T      | $\gamma$ -T     | $\beta$ -TTR    | $\gamma$ -TTR   | $\delta$ -T     |       |
| Crua          | 167,13 $\pm$ 3,58         | 1,29 $\pm$ 0,01 | 5,79 $\pm$ 0,05 | 6,64 $\pm$ 0,09 | 0,21 $\pm$ 0,00 | 0,84 $\pm$ 0,01 | 0,68 $\pm$ 0,03 | 182,6 |
| 125 °C/15 min | 161,58 $\pm$ 0,58         | 1,58 $\pm$ 0,05 | 5,61 $\pm$ 0,04 | 4,72 $\pm$ 0,06 | 0,24 $\pm$ 0,00 | 0,81 $\pm$ 0,02 | 0,57 $\pm$ 0,01 | 175,1 |
| 125 °C/30 min | 168,97 $\pm$ 0,20         | 1,66 $\pm$ 0,02 | 6,40 $\pm$ 0,03 | 8,22 $\pm$ 0,02 | 0,22 $\pm$ 0,01 | 0,85 $\pm$ 0,02 | 0,94 $\pm$ 0,01 | 187,3 |
| 145 °C/15 min | 157,75 $\pm$ 0,13         | 1,94 $\pm$ 0,05 | 5,11 $\pm$ 0,06 | 4,90 $\pm$ 0,05 | 0,21 $\pm$ 0,01 | 0,79 $\pm$ 0,02 | 0,50 $\pm$ 0,01 | 171,2 |
| 165 °C/15 min | 157,65 $\pm$ 0,43         | 4,16 $\pm$ 0,02 | 5,35 $\pm$ 0,01 | 5,22 $\pm$ 0,04 | 0,19 $\pm$ 0,01 | 1,70 $\pm$ 0,03 | 0,73 $\pm$ 0,01 | 175,0 |
| 165 °C/30 min | 155,36 $\pm$ 0,21         | 3,12 $\pm$ 0,03 | 5,17 $\pm$ 0,02 | 3,82 $\pm$ 0,01 | 0,16 $\pm$ 0,01 | 0,93 $\pm$ 0,01 | 0,67 $\pm$ 0,00 | 169,2 |
| 185 °C/15 min | 151,71 $\pm$ 0,12         | 2,50 $\pm$ 0,05 | 4,77 $\pm$ 0,01 | 3,89 $\pm$ 0,02 | 0,17 $\pm$ 0,01 | 0,75 $\pm$ 0,01 | 0,42 $\pm$ 0,01 | 164,2 |
| 200 °C/5 min  | 158,45 $\pm$ 0,72         | 2,84 $\pm$ 0,07 | 5,84 $\pm$ 0,06 | 4,57 $\pm$ 0,00 | 0,23 $\pm$ 0,00 | 1,46 $\pm$ 0,00 | 0,44 $\pm$ 0,00 | 173,8 |

média  $\pm$  desvio padrão de três determinações. Designação das amostras segundo a torra a que foram submetidas. T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

Em todas as amostras o  $\alpha$ -tocoferol foi o composto predominante, seguindo-se os tocoferóis  $\beta$  e  $\gamma$ . Para todas as torras efectuadas, a diminuição do teor total em vitamina E foi sempre inferior a 10% da quantidade inicialmente existente na amostra crua, tendo-se verificado a diminuição mais acentuada na amostra de avelãs torradas a 185 °C /15 min.

Neste estudo verificou-se que, com o aumento da temperatura e tempo de torra, os diferentes vitâmeros apresentaram comportamentos diversos. Relativamente ao  $\alpha$ -tocoferol, vitâmero mais abundante na avelã, observou-se uma ligeira diminuição da sua quantidade inicial, tendo-se atingido a maior perda para a amostra torrada a 185 °C /15 min (menos 9,2 % do que o controlo). Esta amostra foi igualmente a que evidenciou maiores perdas de  $\beta$  e  $\delta$ -tocoferóis (17,6% e 37,5%, respectivamente). Relativamente ao  $\gamma$ -tocoferol, a amostra que apresentou a redução de teor mais acentuada foi a correspondente à torra efectuada a 165 °C /30 min (42,5%), tendo ocorrido perdas quase idênticas na torra a 185 °C /15 min (41,4%). Relativamente à estabilidade dos diferentes tocoferóis quando submetidos a processamento térmico, verifica-se que as conclusões obtidas em alguns estudos não são coincidentes, sendo até por vezes contraditórias. Alguns estudos sugerem que durante o processamento térmico o tocoferol menos estável é o vitâmero  $\alpha$  [4-6], ao passo que outros demonstram que este vitâmero é até bastante estável a elevadas temperaturas [7, 8]. Considerando os resultados apresentados na Tabela 1, constata-se que o  $\alpha$ -tocoferol foi o vitâmero menos afectado pelas condições de torra mais drásticas (decréscimo máximo de 9,2% comparativamente com a amostra crua), ao passo que o vitâmero  $\gamma$ -tocoferol parece ser o vitâmero com maior susceptibilidade ao processamento térmico (decréscimo máximo de 42,5% comparativamente com a amostra crua).

Os valores apresentados na Tabela 1, permitem ainda verificar a ocorrência de aumentos pontuais da quantidade de alguns vitâmeros. A ocorrência deste comportamento foi anteriormente verificado em outras matrizes [8, 9] tendo sido justificado por um aumento da extractibilidade de alguns dos vitâmeros da vitamina E devido ao pré-tratamento térmico aplicado. Lee et al. (2004) e Seybold et al. (2004) sugeriram que os vitâmeros para os quais se verificaram os aumentos poderiam estar ligados a proteínas membranares ou outros compostos, nomeadamente fosfolípidos, ocorrendo a quebra destas ligações em consequência do tratamento térmico, obtendo-se consequentemente extracções com rendimentos superiores.

Resultados anteriormente obtidos para a matriz em estudo parecem estar de acordo com esta hipótese, uma vez que, comparativamente à extração com n-hexano, a saponificação da amostra permitiu aumentar a quantidade extraída de  $\gamma$ -tocoferol (> 7%) e  $\gamma$ -tocotrienol (> 27%), e que com a extração em Soxhlet o rendimento da extração do  $\alpha$ -tocotrienol foi 42% superior [3]. No entanto, esta hipótese não justifica os níveis de  $\alpha$ -tocotrienol obtidos na amostra 165 °C/15 min, cerca de três vezes superiores aos da amostra crua. Pela análise dos espectros obtidos no DAD verificou-se que, para as torras realizadas acima dos 145 °C o pico correspondente ao  $\alpha$ -tocotrienol continha um outro composto, provavelmente um produto de degradação de algum dos tococromanóis existentes na amostra. Este composto, não identificado, apresentou um máximo de absorção a 270 nm e não a 293 nm como seria esperado para o  $\alpha$ -tocotrienol. Como os compostos co-eluem, foram ambos quantificados como  $\alpha$ -tocotrienol, explicando os valores anormalmente elevados verificados em algumas das amostras submetidas a torra.

Comparativamente aos valores obtidos para a amostra crua, verificou-se que a torra realizada durante 30 min a 125 °C conduziu a um aumento do teor de todos os vitâmeros detectados na avelã, obtendo-se um incremento de 2,6% do teor total em Vitamina E. Em alguns casos o aumento em termos de percentagem relativa comparativamente ao controlo foi elevado, especialmente para os vitâmeros  $\delta$ - (39,2%) e  $\gamma$ -tocoferol (23,8%), ao passo que para outros foi reduzido, nomeadamente para os vitâmeros  $\alpha$ -tocoferol (1,1%) e  $\gamma$ -tocotrienol (1,4%). Refira-se ainda que, nos casos do  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol esta foi a única torra onde se verificou este comportamento. No entanto, apesar da torra conduzida nestas condições poder conduzir a um incremento no teor destes compostos benéficos para a saúde, verificou-se que, comparativamente às condições utilizadas pela indústria (145 °C/15 min), as avelãs apresentaram uma coloração menos atractiva e uma maior dificuldade de remoção da película que envolve a avelã.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que, apesar de se assistir a uma tendência de perdas crescentes com os aumentos de temperatura e tempo de torra, a diminuição do teor total em Vitamina E em consequência do processamento térmico parece ser relativamente modesta (máximo de 9,2% comparativamente à amostra crua), observando-se contudo comportamentos diversos por parte dos diferentes vitâmeros presentes na avelã. Tendo-se obtido avelãs com teores superiores nos compostos estudados para a a torra realizada a 125 °C/30 min, poderá ser interessante proceder à realização de testes de análise sensorial por forma a avaliar a aceitabilidade dos consumidores a este produto com coloração amarelada face à avelã obtida em condições industriais com coloração mais atractiva (amarelo-dourado).

## Referências

- [1] – F. Ozdemir, I. Akinci – *J. Food Eng.* **63** (2004) 341
- [2] – P. Fellows – Roasting and Baking. In *Food Processing Technology, Principles and Practice, Second Edition*, CRC Press: Boca Raton (2000)
- [3] – J.S. Amaral, S. Casal, D. Torres, R.M. Seabra, B.P.P. Oliveira – *Anal. Sci.* **21** (2005) 1545
- [4] – E. Niki, T. Saito, A. Kawakami, Y. Kamiya – *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 4177
- [5] – D. Barrera-Arellano, V. Ruiz-Méndez, J. Velasco, G. Márquez-Ruiz, C.J. Dobarganes – *Sci. Food Agric.* **82** (2002) 1696
- [6] – H. Yoshida, N. Hirooka, G. Kajimoto – *J. Food Sci.* **56** (1991) 1042
- [7] – K.I. Holownia, M.C. Erickson, M.S. Chinnan, R.R. Eitenmiller – *Food Res. Int.* **34** (2001) 77
- [8] – C. Seybold, K. Frohlich, R. Bitsch, K. Otto, V. Bohm – *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 7005
- [9] – Y. Lee, S. Oh, J. Chang, I. Kim – *Food Chem.* **84** (2004) 1

# ONION DRYING: KINETIC STUDY AND CHEMICAL CHARACTERIZATION

*Luciano, C.S.G.; Guiné, R.P.F.\*; Barroca, M.J.*

Department of Food Engineering, ESAV, Polytechnic Institute of Viseu  
Quinta da Alagoa, Estrada de Nelas, Ranhados, 3500-606 Viseu, Portugal.  
Telef: +351232480600, Fax: +232426536 e-mail: raquelguine@esav.ipv.pt

**Keywords:** onion, drying, chemical composition, kinetic model

**Abstract:** The present work aimed the experimental study of the drying kinetics of onions at constant temperature (40°C, 60°C and 70 °C) to obtain the drying curves, which were then fitted to different kinetic models of moisture ratio from literature. The experimental data for the moisture ratio content with time was fitted using the software Sigma Plot, v8.0 (SPSS, Inc.).

The study was complemented with the chemical characterization of the onions in fresh and after drying at the lowest and highest temperatures, for evaluation of the effect of drying and drying temperature on the chemical composition of the product. In this way, the analyses made were: moisture content, sugar content, proteins, ash, fibre, acidity and vitamin C.

The results obtained for the nutritive values of dried onion showed that the total sugars, vitamin C and acidity were lost during the drying process and their reduction was increased when temperature raised from 40°C to 70°C. Moreover, to obtain a similar safe moisture content the drying time was reduced about 70% when the temperature was increased from 40°C to 70°C.

## 1. INTRODUCTION

Onion in the general sense can be used for any plant in the genus *Allium* but used without qualifiers usually means *Allium cepa*, also called the garden onion. Onions (usually but not exclusively the bulbs) are edible with a distinctive strong flavour and pungent odour which is mellowed and sweetened by cooking. They generally have a papery outer skin over a fleshy, layered inner core. Used worldwide for culinary purposes, they come in a wide variety of forms and colours. Despite the variation of nutritive values in some onions varieties described in literature<sup>[1,2,3]</sup>, these values clearly demonstrate a considerable amount of moisture as well as fairly large amounts of carbohydrates and small amounts of protein and fat. In addition, the onion appear to be at least somewhat effective against colds, heart disease, diabetes, osteoporosis, and other diseases and contain anti-inflammatory, anticholesterol, anticancer, and antioxidant components such as quercetin<sup>[4,5]</sup>.

Onions are available in fresh, frozen, canned, and dehydrated forms. Onions can be used usually chopped or sliced, in almost every type of food, including cooked foods and fresh salads, and as a spicy garnish; they are rarely eaten on their own, but usually act as accompaniment to the main course. In the commercial-scale manufacture of soups, sauces, packet food and many other convenience foods, dehydrated onion is generally preferred to its fresh counterpart, since it has better storage properties and is easy to use<sup>[6]</sup>. Furthermore, the preservation of vegetables, such as onion, in the dried form is commonly practised to reduce the bulk handling, to facilitate transportation and to allow its use during the off-season.

Drying of food materials is a complex process involving simultaneous coupled heat and mass transfer phenomena occurring in the material being dried. These coupled phenomena make the analysis of the drying process a complex problem, and the theoretical models available for heat and mass transfer can not describe the process with accuracy. Moreover, the exact application of these principles to a food product becomes difficult due to its complex structure

and to the physical and chemical changes that occur during drying. Drying models (either empirical or mechanistic) describe the mechanism of heat and mass transport and correlate the influence that certain process variables exert on the moisture removal process. The representation of the material moisture content as a function of time under constant drying conditions constitutes the so-called drying curve.

## 2. MATERIALS AND METHODS

The commercial onions used in this study had, in the fresh state, a moisture content of 88.7%. The fresh and dried onion samples were analysed in respect of moisture content, acidity, sugars, proteins, ash, crude fiber and vitamin C. The onions for the experiments were handpeeled and washed and to obtain the dried samples the onion was sliced into 2.0-3.0 mm thick slices, and dehydrated in a ventiated chamber at constant temperature. The chemical analysis of both fresh and dried pulp onion was done, in triplicate, with milled samples.

Moisture content of fresh onions was determined by vacuum oven method<sup>[7]</sup> and to dried samples was used a Halogen Moisture Analyzer (Mettler Toledo HG53). Acidity and vitamin C was estimated by a volumetric titration. Total sugars were measured in °Brix trough a refractometer apparatus. Protein content was estimated by the micro-Kjeldhal digestion procedure according to previous established methodologies and crude fibers by sequential hot digestion of the sample with dilute acid and alkaline solutions<sup>[7]</sup>.

## 3. RESULTS AND DISCUSION

### 3.1 Chemical characterization

The drying process was carried out at constant temperatures of 40°C, 60°C and 70°C until the onion samples reached a safe moisture content below 5%. Moreover, to analyse the effect of this operational condition on the nutritive value of the dried product, the samples obtained by drying with the lowest and highest temperatures were characterized in chemical terms.

The moisture content of the fresh onion was around 88.7% and, after drying at 40°C and 70°C was 3.3% and 3.1% respectively. The results of the nutritive value of both fresh and dried onion samples are presented in Table 1, and the values are expressed in a dry weight basis. The chemical composition revealed that fresh onion is rich in water and carbohydrates and has small amounts of protein. The variation of nutritive values of this onion as compared with other results described in literature can be attributed to different varieties<sup>[1,2,3]</sup>.

**Table 1** - Chemical composition of the fresh and dried onion at 40 °C and 70 °C (expressed as a percentage of the dry mass)

|             | Fresh | Dried at 40°C | Dried at 70°C |
|-------------|-------|---------------|---------------|
| Protein     | 0.4   | 0.1           | 0.08          |
| Crude fibre | 5.3   | 6.1           | 4.8           |
| Ash         | 3.4   | 5.3           | 5.1           |
| Total sugar | 55.4  | 40.3          | 33.4          |
| Vitamin C   | 1.6   | 0.14          | 0.09          |
| Acidity*    | 37,6  | 20.8          | 15.9          |

\* ml/100g dry mass

As it can be seen, the drying process has no significant effect on the nutritive value of onion, except on total sugars, vitamin C and acidity. In fact, their values were reduced with temperature since the reaction of sugars, vitamin C and the evaporation of volatile compounds are dependent of this operating condition. Thus, increasing the temperature from 40°C to 70°C increases the loss of sugars, acidity and specially vitamin C.

### 3.2 Kinetic model

The batch drying curves obtained for the temperatures of 40°C, 60°C and 70°C revealed a similar kinetic behaviour, but with a decreasing stabilization time: around 13.3, 8.0, and 4.0 hours, respectively, to reach a final moisture contents of 4.3%, 4.7% and 2.5%.

The moisture ratio ( $MR=(W-W_e)/(W_0-W_e)$ ) in dry basis versus time (t) for the three temperatures studied was fitted to four models (Table 2) well documented in the literature<sup>[4,8]</sup>, namely the Henderson and Pabis, Logarithmic, Newton and Modified Page approaches, using the software Sigma Plot, v8.0 (SPSS, Inc.). The equilibrium moisture content was determined from the drying curve, taken for a higher time, assuming no more moisture was exchanged from the samples to the surrounding atmosphere of the chamber.

**Table 2** – Kinetic models applied to the moisture ratio values.

| Model               | Equation               | Parameter |
|---------------------|------------------------|-----------|
| Henderson and Pabis | $MR = a \exp(-kt)$     | a, k      |
| Logarithmic         | $MR = c + a \exp(-kt)$ | c, a, k   |
| Newton              | $MR = \exp(-kt)$       | k         |
| Modified Page       | $MR = \exp(-(kt)^n)$   | k, n      |

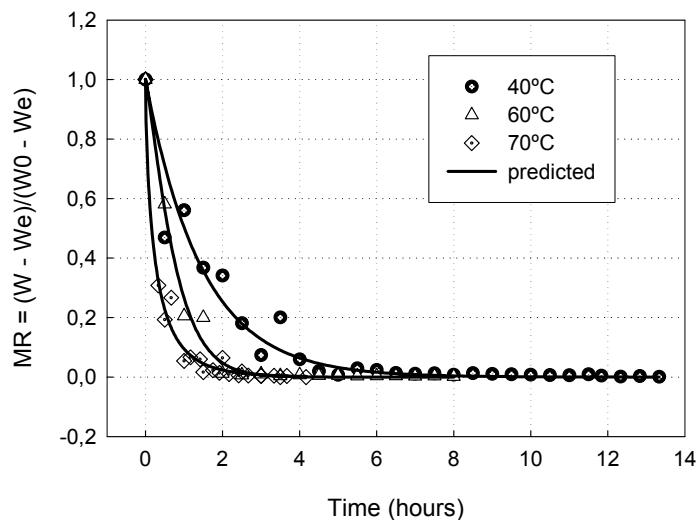
To compare the performance of the four models the respective correlation coefficient (R) as well as the standard deviation of each parameter of the corresponding model were determined. As shown in Table 3, the values obtained for the correlation coefficient with the different fittings of the models to the three temperatures present a variability between 0.967 and 0.995. This coefficient was one primary criterion for selecting the best equation to describe the convective drying curves of onion samples.

**Table 3** – Results of the fitting to the different kinetic models, to temperatures of 40°C, 60°C and 70°C.

| Model               | Parameter | 40°C            | 60°C            | 70°C            |
|---------------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Henderson and Pabis | a         | 0,9137(±0,0457) | 1,0170(±0,0317) | 0,8849(±0,0392) |
|                     | k         | 0,6266(±0,0514) | 1,3325(±0,0796) | 2,5157(±0,2421) |
|                     | R         | 0,973           | 0,993           | 0,977           |
| Logarithmic         | c         | 0,0030(±0,0141) | 0,0029(±0,0103) | 0,0164(±0,0149) |
|                     | a         | 0,9124(±0,0471) | 1,0193(±0,0335) | 0,8726(±0,0412) |
|                     | k         | 0,6342(±0,634)  | 1,3213(±0,0920) | 2,7172(±0,3175) |
|                     | R         | 0,973           | 0,993           | 0,978           |
| Newton              | k         | 0,6868(±0,0456) | 1,3143(±0,0690) | 2,8063(±0,2789) |
|                     | R         | 0,990           | 0,992           | 0,9632          |
| Modified Page       | k         | 0,7613(±0,0621) | 1,2630(±0,0569) | 3,7812(±0,8723) |
|                     | n         | 0,7765(±0,0744) | 1,2009(±0,1061) | 0,6258(±0,1221) |
|                     | R         | 0,976           | 0,995           | 0,978           |

Afterwards, by analyzing the standard variation of the equations parameters and the capacity to describe the experimental results to each temperature we can conclude that Newton and Modified Page are the best to represent the onion drying curves at 40°C, 60°C and 70°C.

Figure 1 illustrates the experimental moisture ratio for the different temperatures and the predictions obtained using the best model to each drying temperature. As it can be seen the models have a good performance to reproduce the experimental data throughout the entire range of values.



**Figure 1** - Profile of experimental and predicted moisture ratio curves at different temperatures.

As shown in the figure, the kinetic behaviour is similar for all temperatures, but it is clear that increasing the temperature accelerates the drying process considerably. The drying time, to reach a safe moisture, decreased from 13.3 to 4.0 hours when the temperature was increased from 40°C to 70°C. It is still clear that the higher percentage of weight loss occurs during the first drying stage, when the slope of the curves is higher.

## References

- [1] - Abhayawick, L.; Laguerre, J. C.; Tauzin, V.; Duquenoy, A. *Physical properties of three onion varieties as affected by the moisture content*, Journal of Food Engineering, 55: 253-262 (2002).
- [2] - Rapusas, R. S.; Driscoll, R. H. *Thermophysical properties of fresh and dried white onion slices*, Journal of Food Engineering, 24: 149-164 (1995).
- [3] - Mota, C. I. L. *Caracterização e estudo da desidratação da cebola*, Trabalho Final de Curso, pp. 71 (2002).
- [4] - Van Boekel, M. A. J. S.; Jongen, W. M. F. *Product quality and food processing: how to quantify the healthiness of a product*, Cancer Letters, 114: 65-69 (1997).
- [5] - Ewald, C.; Fjelkner-Modig, S.; Johansson, K.; Sjöholm, I.; Akesson, B. *Effect of processing on major flavonoids in processed onion, green beans and pears*, Food Chemistry, 64: 231-235 (1999).
- [6] - Rapusas, R. S.; Driscoll, R. H.; Srzednicki, G., S. *Bulk density and resistance to sliced onions*, Journal of Food Engineering, 26: 67-80 (1995).
- [7] - Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 15th Ed., Arlington (1990).
- [8] - Yaldyz, O.; Ertekyn, C. *Thin layer solar drying of some vegetables*, Drying Technology, 19: 583-597 (2001).

# OPTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DE BRANQUEAMENTO EM TERMOSSONICAÇÃO NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE EM ABÓBORA (*Cucurbita maxima* L.)

Pinheiro, J.<sup>1</sup>, Alegria, C.<sup>1</sup>, Abreu, M.<sup>1</sup>, Gonçalves, E.M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares, INETI

Estrada Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

Tel +351-21 712 7153 Fax +351-21 712 7116 e-mail: [elsa.goncalves@mail2.ineti.pt](mailto:elsa.goncalves@mail2.ineti.pt)

**Palavras-chave:** abóbora, termossonicação, qualidade, peroxidase, RSM.

## Resumo:

Este trabalho teve como objectivo determinar a intensidade térmica mais favorável em termossonicação, por forma a inactivar 80% da actividade da enzima peroxidase (POD) e promover a retenção máxima dos atributos da qualidade (cor e textura), em abóbora (*Cucurbita máxima* L.). Para a optimização do tratamento, efectuou-se um delineamento experimental, segundo a metodologia de superfície de resposta (RSM), tendo como variáveis independentes, a temperatura (50°-70°C) e o tempo (1-15 min), e variáveis dependentes, a actividade da POD e ambos os atributos de qualidade. As condições de sonicação utilizadas em todos os ensaios foram de 45kHz de frequência e 80% de potência.

## 1. INTRODUÇÃO

A abóbora (*Cucurbita máxima* L.), originária da América do sul, pertence à família das Cucurbitáceas e apresenta um elevado valor nutricional, sendo largamente utilizada na dieta alimentar portuguesa como ingrediente base de sopas e diversas receitas de doçaria tradicional. O processamento e /ou transformação da abóbora é quase inexistente no nosso país, pelo que a sua congelação constitui uma alternativa promissora para uma oferta como produto de conveniência.

O branqueamento convencionalmente efectuado em água, na gama de temperatura de 85°-100°C por tempos variáveis é uma operação indispensável no processamento de vegetais congelados por promover a inactivação de enzimas responsáveis por alterações da qualidade durante o período de armazenagem [1]. No entanto, este tratamento térmico pode, por sua vez, conduzir a perdas sensoriais e nutricionais indesejáveis. De forma a minimizar este impacto negativo, tecnologias alternativas de branqueamento têm vindo a ser estudadas, como é disso exemplo a termossonicação. A aplicação desta tecnologia que conjuga a aplicação de ultrassons e de calor permite pelos efeitos sinérgicos associados, baixar a intensidade térmica referida contribuindo para a minimização da deterioração sensorial e nutricional [2].

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima

Para a elaboração deste trabalho foi utilizada abóbora (ca de 18 kg), proveniente do mercado abastecedor da região de Lisboa (MARL). Procedeu-se às operações de descasque e corte, em quadrados (2\*2\*1cm). Os tratamentos de termossonicação das amostras (1 kg/tratamento) foram realizados num banho termostatisado de ultrassons da *Elma Transsonic Cleaning Baths - 78224 Singen/Htw*, com capacidade de 45 l, a 45 kHz de frequência e 80% de potência. O controlo de temperatura no centro do quadrado foi efectuado com termopares Ellab calibrados

(tipo T). Após cada tratamento as amostras foram arrefecidas em banho de água / gelo (1 min) eliminando-se de seguida o excesso de água (papel absorvente) e procedendo-se ao controlo analítico.

## 2.2 Métodos analíticos

### Determinação da actividade enzimática da peroxidase

A actividade da enzima peroxidase (POD) foi determinada segundo o método modificado descrito por [3]. A enzima foi extraída por homogeneização (13500 rpm - 1 min) da amostra em solução de cloreto de sódio (NaCl, 1M), na proporção de 1:5 (m/v). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 470 nm. Os resultados da actividade da POD, expressos em Abs.min.ml<sup>-1</sup> de actividade, correspondem à média de 8 leituras por amostra.

### Avaliação da cor

Os parâmetros de cor foram determinados através do sistema de coordenadas CIE  $L^*a^*b^*$ , recorrendo-se a um colorímetro triestimulos (modelo CR-300, Minolta Corporation Japan), calibrado com uma placa branca ( $L = 94,40$ ;  $a = -0,85$  e  $b = 0,18$ ) e utilizando o iluminante C. Foi calculada a diferença total de cor (DTC), através da equação 1, onde  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$ , representam os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos registos da amostra em fresco, respectivamente. Os resultados apresentados correspondem à média de 24 determinações por amostra.

$$DTC = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

### Avaliação da textura

A textura das amostras foi determinada através do texturómetro (*Stable Micro Systems TA-Hdi Texture Analyser*), nas seguintes condições: célula de carga de 50 kg, sonda *cilíndrica* (*diâmetro de 5 mm*), velocidade de penetração de 1 mm/s e distância de penetração de 5 mm. O parâmetro de força máxima (N) foi utilizado como índice de firmeza. Os resultados apresentados correspondem à média de 24 determinações por amostra.

### Análise Estatística

As condições de termossonicação foram delineadas experimentalmente segundo a metodologia de superfícies de resposta (RSM - matriz factorial composta rotativa de tendência central com adição de 2 pontos centrais), definindo como variáveis independentes a temperatura (50-70 °C) e o tempo de tratamento (1-15 min), e as variáveis dependentes, os parâmetros de cor, de firmeza e a actividade da POD.

A análise ANOVA para comparação de médias (teste de Tukey;  $p=0.05$ ) efectuou-se com recurso ao Software Statistica<sup>TM</sup> v.6.1 da Stasoft.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Actividade enzimática da POD

A abóbora fresca apresentou um valor inicial de actividade da peroxidase (POD) de  $18.2 \pm 0.9$  Abs.min.ml<sup>-1</sup>.

A superfície de resposta obtida para a actividade da POD (figura 1), expressa em % relativamente à amostra em fresco, apresenta valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$  muito próximos de 1, indicando o carácter predictivo do modelo.



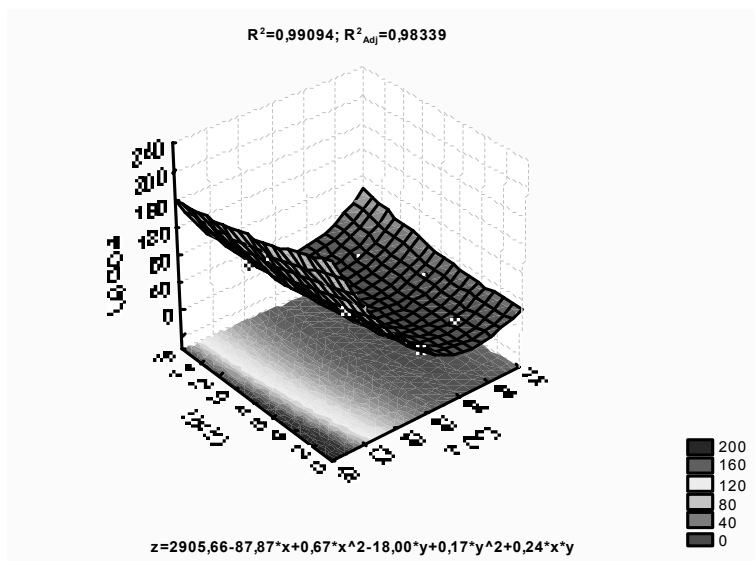


Figura 1 – Superfície de resposta da actividade da enzima POD (%) da abóbora termossonicada a diferentes intensidades.

O aumento da temperatura e do tempo de termossonicação provocam uma redução significativa da actividade desta enzima exercendo a temperatura o efeito mais significativo ( $p=0.00006$ ).

Um nível de 80% de inactivação inicial da POD, recomendado por Günes e Bayindirh [4] por forma a alcançar a estabilidade do produto, foi obtida para a sonicação combinada com calor à intensidade de 71 °C - 2 min.

### Cor

Na figura 2 apresenta-se a superfície de resposta referente ao parâmetro  $L^*$  da cor. Também neste caso o modelo obtido apresenta um bom ajuste ( $R^2=0.98002$  e  $R^2_{ajustado}=0.96337$ ). A combinação de calor e sonicação na condição testada, conduziu a um escurecimento da abóbora (valores de  $L^*$  menores face aos registados na matéria prima), sendo este mais dependente da temperatura ( $p=0.001$ ) do que do tempo de tratamento ( $p=0.005$ ). Para o tratamento na intensidade (70°C - 8 min) registou-se um valor de  $L^*$  de  $57.4 \pm 4.3$ , reflectindo o escurecimento máximo de 16%, face à amostra em fresco.

Na condição otimizada para a estabilização enzimática do produto (71 °C - 2 min), a alteração do parâmetro de cor  $L^*$  foi de 8%.

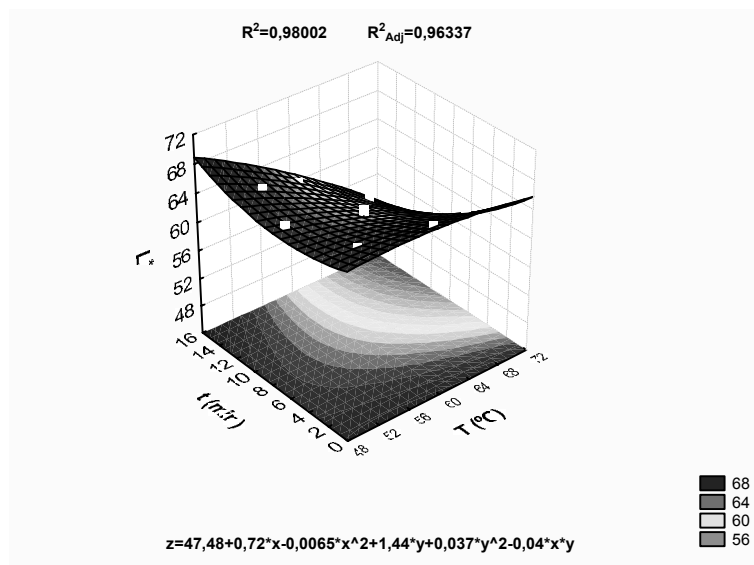


Figura 2 – Superfície de resposta do parâmetro de cor  $L^*$  da abóbora termossonicada a diferentes intensidades.

Na figura 3 encontra-se a superfície de resposta para o cálculo da diferença total de cor (DTC) da abóbora termossonicada. Após a análise ANOVA, verifica-se que a DTC na abóbora tratada é dependente da temperatura ( $p<0.05$ ) e independente do tempo de tratamento ( $p>0.05$ ).

Verifica-se que a elevação da temperatura acima de 68°C, conduz a alterações de cor, valores de DTC maiores de 12, correspondentes a grandes diferenças de cor, segundo o critério de Drlange [5].

### Firmeza

A abóbora em fresco, apresentou um valor de firmeza de 23.9±5.9N. O modelo da superfície de resposta para a firmeza (N) (figura 4), apresenta um ajuste adequado ( $R^2=0.97017$  e  $R^2_{ajustado}=0.94531$ ). Verificou-se que as variações de firmeza foram influenciadas de forma mais significativa pela temperatura ( $p=0.004$ ) do que pelo tempo ( $p = 0.007$ ). Para a condição seleccionada de 71 °C - 2 min, a firmeza da abóbora sofreu uma ligeira redução de 12%,

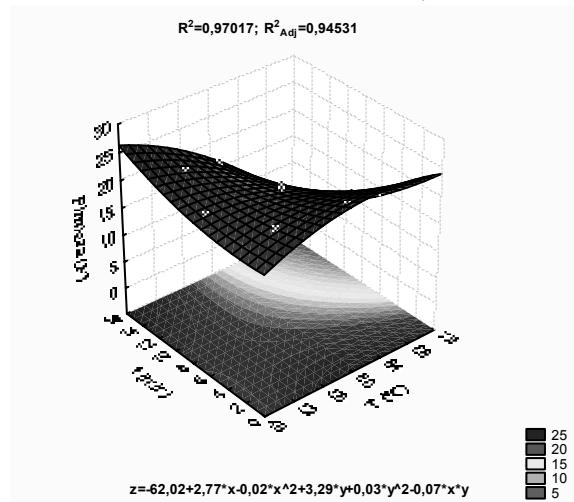


Figura 4 – Superfície de resposta da firmeza (N) da abóbora termossonicada a diferentes intensidades.

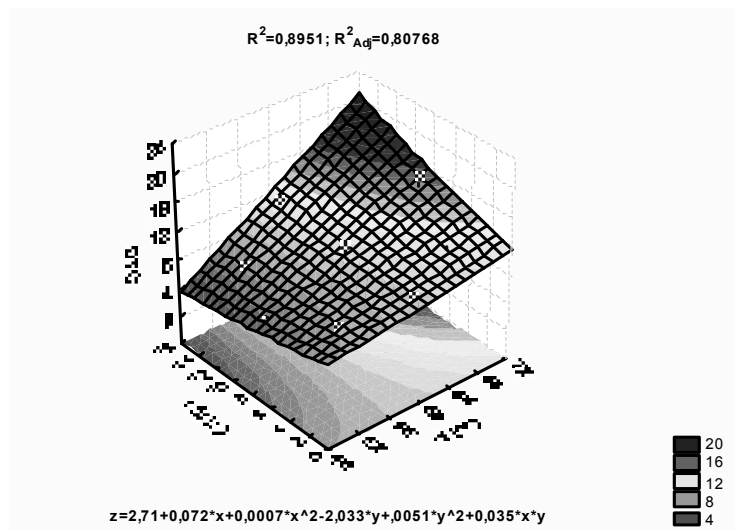


Figura 3 – Superfície de resposta do parâmetro de cor DTC da abóbora termossonicada a diferentes intensidades.

relativamente à amostra em fresco.

### 4. CONCLUSÕES

A termossonicação (71 °C – 2 min, 45kHz, 80%) promove uma inactivação de 80% da enzima POD com um comprometimento mínimo dos atributos da qualidade em fresco, revelando esta tecnologia uma alternativa promissora ao branqueamento convencional em água.

### Referências:

- [1] C.Ganthavorn, C.W. Nagel, J.R. Powers – *Thermal of inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase* – Journal of Food Science **56** (1) (1991) 41.
- [2] D. Knorr, B.I.O. Ade-Omowaye, V. Heinz – *Nutritional improvement of plant food by non-thermal processing* – Proceedings of Nutrition Society. **61** (2002) 311.
- [3] V. BIFANI, J. INOSTROZA, M. J. CABEZAS, M. IHL - *Determinación de parámetros cinéticos de peroxidasa y clorofilas en judías verdes (Phaseolus vulgaris cv. Win) y estabilidad del producto congelado* – Revista Afinidade de Enero – Tomo LIX. **497** (2002) 57.
- [4] B. Günes, A. Bayindirh – *Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots.* – Lebensmittel-Wissenschaft und Technology, **26** (1993) 406.
- [5] DRLANGE – *Colour review* – Drlange Application Report **8**, USA Drlange (1994).

# SORPTION ISOTHERMS OF EGGPLANT (*Solanum melongena*) IN THE RANGE OF TEMPERATURES FROM 278 TO 333 K

Chenlo, F., Moreira, R., Silva, C. and Vallejo, N.\*

Departamento de Enxeñaría Química, E.T.S.E., Universidade de Santiago de Compostela.  
Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n, 15782, Santiago de Compostela (Spain)  
Tel +34 981 563 100 (ext: 16752) Fax 981 528041 e-mail noelavs@usc.es

**Key words:** isotherms, eggplant, drying.

**Abstract:** The three principal aims of this work are to obtain experimental equilibrium sorption isotherms of common eggplant at different temperatures, to employ GAB model in order to describe the isotherms, and to calculate the monolayer moisture content. As experimental technique the gravimetric method was employed, which is based on the use of saturated salt solutions to maintain a fixed water activity when the equilibrium is reached. The experiments were developed at different temperatures, (5, 25, 45 and 65 °C). Samples were periodical weighed until reached constant weigh. Dried solid of each sample was determined in the vacuum-heater. Experimental equilibrium data at each temperature were analysed determining sorption isotherms of types II and III, according Brunauer's classification. Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) model was used to fit the experimental data because it is a model that shows a very good behaviour with sigmoid shaped sorption isotherms typical for many food products. This three parameters model correlates satisfactorily the experimental results at lower temperatures.

## 1. INTRODUCTION

Eggplants (*S. melogena*) are vegetables with high economical interest and nutritional value. The use of this food material is very extensive in food and health industry. The eggplants are original from three continents, Asia, Africa and South America. The best known eggplant specie is *Solanum melongena* widely cultivated in Asia (78 % of world production) and also in the Mediterranean countries (Turkey is the main producer with 19 % of world production). The most relevant aspects in the eggplant composition are the high content of water, average moisture content is around 93 %, and its low content in fats (0.18 %). These characteristics turn into the eggplant an ideal food for diets.

Sorption properties of foods are essential for the design and optimization of many processes in food industry such as drying, packaging and storage. Much information about the equilibrium moisture content of foodstuffs can be found in the literature and also some collection of data [1-2]. Scarce data (in a restricted range of temperatures and water activities) can be found for adsorption process [1-3], but no equilibrium data were found for desorption phenomena. The three principal objectives of this work are to obtain experimental equilibrium sorption isotherms of eggplant fruit at different temperatures, to use a suitable model describing the isotherms, and to calculate the corresponding parameters. The Guggenheim-Anderson-deBoer model (GAB) [4] was employed to fit the experimental data because it shows a very good agreement with sigmoid shaped sorption isotherms. This model allows prediction of some useful variables as monolayer moisture content and heats of sorption as a function of the moisture content of the product. The GAB equation is a function of equilibrium moisture content,  $X_e$  (dry basis), with water activity,  $a_w$ , and is expressed as:

$$X_e = \frac{X_m CKa_w}{(1 - Ka_w)(1 - Ka_w + CKa_w)} \quad (1)$$

where  $X_m$  is the monolayer moisture content (dry basis), and C and K are other parameters that can be related to temperature in order to evaluate different sorption heats [5]. In this way, this model with three parameters can simulate the sorption isotherms at several temperatures and the parameters have physical relevance. To calculate the goodness of fit was calculated the correlation coefficient ( $R^2$ ) and the mean relative deviation modulus (P) defined as:

$$P = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{X_{GAB} - X_{EXP}}{X_{EXP}} \quad (2)$$

where values of P below 10 % are indicative of a good fit [6].

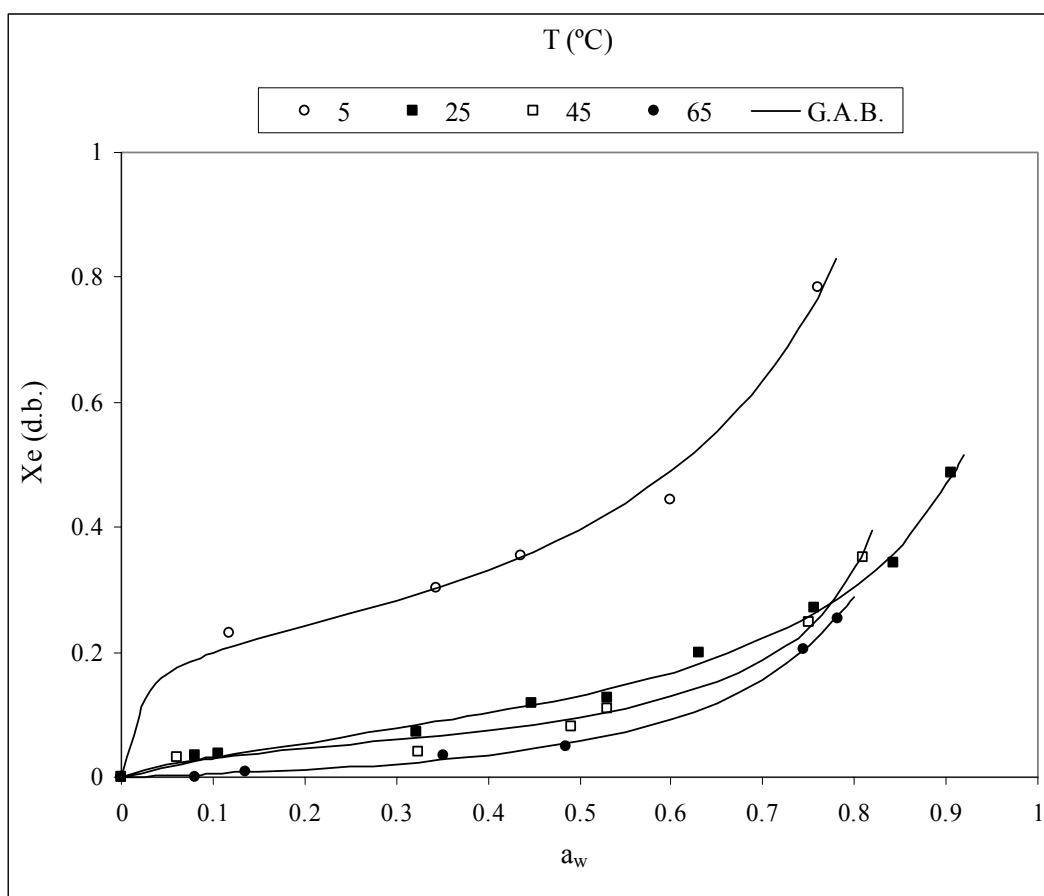
## 2. MATERIAL AND METHODS

Eggplant fruits provided by Alicante (Spain) farmer, were used in this study. The samples were assayed as cut in thin pieces (0.5 mm, approximately), and the seeds were previously removed. As experimental technique the gravimetric method was employed, which is based on the use of saturated salt solutions to maintain a fixed water activity when the equilibrium is reached. The salt solutions used to obtain constant water activities environments were KOH, LiCl, MgCl,  $K_2CO_3$ ,  $Mg(NO_3)_2$ ,  $NH_4NO_3$ , NaCl, KCl y  $BaCl_2$ ; this group allow to obtain a wide range of relative humidity of air, from 0.07 to 0.91. The experiments were carried out at different temperatures, (5, 25, 45 and 65 °C). Water activity values at these temperatures can be found in the bibliography [7].

In order to avoid sample decomposition (by microbial spoilage) at high relative humidity (> 70 %) crystalline thymol was placed in the system. Duplicated samples of, approximately, 800 mg were stored in a constant relative humidity atmosphere and were periodically weighed until they reached constant weight (two months, approximately). The moistures content of each sample was determined in a vacuum-heater at 70 °C and < 15,000 Pa.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The experimental equilibrium moisture content data of eggplant for desorption process obtained at different temperatures and water activities are shown in Figure 1. It was observed, in all the cases, the moisture content at a determined water activity decreases as the temperature increases. It must be highlighted the differences between the isotherms obtained at the two lower temperatures. Comparing the experimental equilibrium moisture content data at a given water activity, it can be observed at 5 °C it has the highest values. At high water activities (i.e. 0.8) and 5 °C starting from fresh fruit (with water content of 0.93 d.b.) it requires just a reduction up to 0.79 d.b. of moisture content for its proper preservation (at 25 °C it is necessary to reduce the moisture content up to 0.25 d.b. In addition, each isotherm shows an increase in the equilibrium water content with an increase of the water activity. This dependence is non lineal and different for each studied temperature. Therefore, the isotherms corresponding to the low temperatures (5 and 25°C) can be considered as isotherms type II in the Brunauer's classification and the corresponding to the higher temperatures (45 and 65°C) to the type III of the referred classification. This behaviour has been previously described in the literature, for other foodstuffs [5].



**Figure 1.** Water desorption isotherms of eggplant at different temperatures

The experimental data were fitted by means of different models. The best fit was found with the GAB model. The values of the obtained parameters, the correlation coefficients and the mean relative error (P) are shown in Table 1.

It was observed that the GAB model fits satisfactorily the experimental data for 5 and 25 °C (P values lower than 10%). The parameters at 65°C are shown in order to compare even the data do not follow the acceptable fit criteria. Nevertheless, the values found with this model has physical meaning when the isotherms correspond to the type II cited above. Therefore, the obtained values for 45 and 65°C isotherms should not be used to the physicochemical analysis of desorption processes. Following the range of physical validity of the model, it was observed a strong decrease in the monolayer moisture content with the temperature.

**Table 1.** Values of the GAB model parameters and statistic parameters for desorption isotherms of eggplant (*S. melogena*) at different temperatures

| T (°C) | $X_m$ | C      | K     | $R^2$ | P     |
|--------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 5      | 0.210 | 56     | 0.960 | 0.969 | 4.45  |
| 25     | 0.092 | 4.495  | 0.902 | 0.995 | 9.75  |
| 45     | 0.048 | 10.921 | 1.073 | 0.908 | 18.86 |
| 65     | 0.104 | 0.406  | 0.982 | 0.908 | 42.74 |

## 4. CONCLUSIONS

The equilibrium moisture content data at different temperatures were experimentally obtained for eggplant samples by means of the gravimetric method. The desorption isotherms for 5 and 25 °C were satisfactorily fitted to the GAB model. The fit parameters have been obtained. It was found that the type of the isotherms varies with the temperature. The physical meaning of the parameters was analyzed for type II isotherms according to Brunauer's classification.

## Acknowledgements

*The authors acknowledge the partial support to Xunta de Galicia with the project (PGIDIT04TAL265004PR)*

## References

- [1] – H.A. Iglesias, J. Chirife – *Water sorption parameters for food and food components. Handbook of food isotherms*, Academic Press, New York (1982).
- [2] – W. Wolf, W.E.L. Spiess, C. Jung – *Sorption isotherms and water activity of food materials*, Science and Technology Publishers, Essex, England (1985).
- [3] – E. Ayranci – *Nahrung-Food* **39** (1995) 228
- [4] – H. Bizot - *Using the GAB model to construct sorption isotherms. In Physical Properties of Foods*, Applied Science Publishers, New York (1983).
- [5] – R. Moreira, F. Chenlo, M.J. Vázquez, P. Cameán – *J. Food Eng.* 71 (2005) 193
- [6] – C.J. Lomauro, A.S. Bakshi, T.P. Labuza – *J. Food Sci.* **50** (1985) 385
- [7] – L. Greenspan - *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **81A(1)** (1977) 89

# SORPTION ISOTHERMS OF MEDLAR FRUITS (*Mespilus germanica L.*) AT 25 °C

Chenlo, F., Moreira, R., Silva, C.\*

Departamento de Enxeñaría Química, E.T.S.E., Universidade de Santiago de Compostela

Rúa Lópe Gómez de Marzoa s/n, 15782. Santiago de Compostela. Spain

Tel +34-981 563 100 ext. 16752 Fax 34-981528 050 e-mail: [claudiab@usc.es](mailto:claudiab@usc.es)

**Key words:** isotherms, desorption, medlars

**Abstract:** The experimental equilibrium moisture content (EMC) data for medlar fruits in the water activity range from 0.08 to 0.90 at 25 °C were obtained to describe the equilibrium sorption isotherms. In order to characterize each part of the fruit, peel, pulp and seeds were assayed separately to relate to the physiological and composition aspects involved. The sorption behaviour was followed by the gravimetric method. Desorption was observed in all samples at the studied conditions. Equilibrium moisture content data were evaluated by means of the mathematical models adopted as standards equations and those usually applied to foodstuffs (Guggenheim-Anderson-de Boer, the modified ones of Oswin, Halsey and Henderson, Lewicki, and Peleg). The best fit of the experimental data was obtained with the G.A.B. model. Also, the monolayer moisture content was calculated. Type II sorption isotherms according to Brunauer's classification, were obtained in all cases. Increasing equilibrium moisture contents were obtained in the order: seeds, peel and pulp as expected because of the different characteristics and composition of the tissues. The discussion drives some inferences about the storage considerations at 25 °C of this seasonal fruit.

## 1. INTRODUCTION

Medlar is an edible fruit (*Mespilus germanica L.*) member of the Rosaceae family, native to southeastern Europe, Anatolia, Crimea, Caucasia and the northern parts of Iraq and Iran [1]. It is a pome-like fruit ranging from 1.5 to 3 cm in diameter [2]. Among the common varieties of medlar fruit well-known through Europe and Asia are Dutsch, common (*M. germanica*), Royal, Nottingham and Stoneless.

Its reported composition refers water 72.2% [3], protein 0.40%, fat 0.50%, carbohydrates 10.60%, fiber 10.20% and other components [4]. The edible part is the 62.00% of the fruit [4]. Its consumption is popular as fresh fruit after bletting, because of the ripped fruits are not still edible. It is usual the harvest of bletted fruit on the plant in late autumn, bletted by cold storing to promote the breakage of the cells structure or the harvest of fruits at physiological ripening and their storage in straw until over-ripening. [2]. They are widely preserved and consumed as pickle or liqueur [1]. Jams and jellies are appreciated by their sweet but slightly acid flavour [2].

The study of the edible fruits has become of recent interest. The physical (weight, colour, firmness), physicochemical (pH, soluble solids) and chemical (moisture, soluble sugars, starch) changes during maturation of Spanish medlar have been reported [2]. More recently, changes in mineral composition, at different stages of maturity of medlar and fatty acid composition, during ripening of medlar have been reported [2]. Besides these studies, data about preservation conditions or controlled ripening of medlars are still scarce. The progress on these aspects is interesting related to the particular and traditional process of bletting.

In addition, the seeds are source of essential oil because of its composition, being of interest the benzaldehyde as main component (98.49 %) [5]. The peel has been subject of recent studies about the antioxidant capacity of its extract [6, 7].

The determination of sorption isotherms allow to describe the changes in the water content of the fruit with the moisture, and would infere about the optimal storage conditions of the fruit at room temperature. A large number of models were proposed in the literature for sorption isotherms [8].

The aim of the present work was to study the water sorption behaviour of medlar fruits and find, between a set of mathematical models applied to food materials, the most suitable for describing the isotherms.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Fresh ripe medlar fruits (*M. germanica L.*) from Valencia (Spain), spring harvest (may 2006) were used. In order to study the sorption behaviour of each part of the fruit, peel, pulp and seeds were assayed. Each part was separated and cut in pieces. Peel was cut into sheets; pulp and seeds into small cubes. Duplicate samples of each item were placed in closed containers containing the saturated solutions and keep in a oven at  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . At water activities higher than 0.7, thymol was used in order to preserve the samples from spoilage.

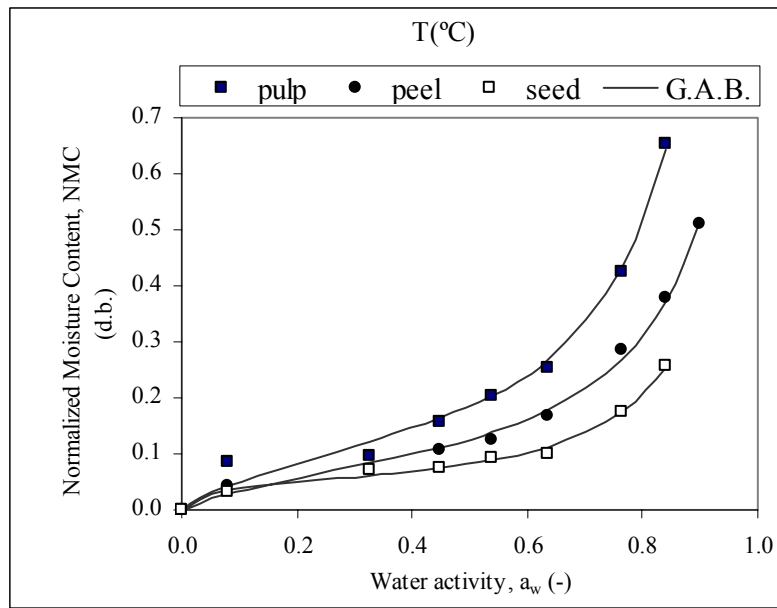
To achive a range of moisture environments different saturated salt solutions were used. The salts used were KOH, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaCl, KCl and BaCl<sub>2</sub> [9]. 2002]. The experimental water activities were previously determined [10], obtaining a range of water activity from 0.08 to 0.9 at 25 °C. The samples were weighed in an analytical balance (Mettler AJ150). The criteria for equilibrium state was a weight change less than 0.1% in a period of a week. The dry basis was determined at 70 °C and 100 mmHg in a vacumm oven (Heareus Vacutherm VT 6025) until constant weight ( $\pm 0.0005\text{ g.}$ ).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The experimental equilibrium moisture contents (EMC) of each assayed part of medlar fruits (pulp, peel and seeds) at 25 °C are shown in Fig. 1. All the obtained data corresponded to desorption processes in the range of water activity from 0 up to 0.9. In all water activity range, at the same water activity value, pulp samples showed higher EMC values than peel and the lowest values were found for seeds samples. At water activities higher than 0.3 it is clearly observed a great difference among the studied parts. Compared at the same water activity (i.e.,  $a_w$  0.80) it is shown the EMC value of peel samples is attained approximately at 0.4 d.b., meanwhile for the pulp corresponds to 0.65 d.b., and finally 0.2 d.b. value for seed samples. Previous data are clearly related to the initial moisture content and the functional role of the differenced parts analyzed in this study.

The water desorption isotherms can be included as type II according to Brunauer's classification. This type of isotherms is very typical in food materials.





**Figure 1** – Experimental and predicted data with GAB model of equilibrium moisture content for desorption of pulp, peel and seeds of medlar fruits at 25 °C

The sorption models listed in Table 1 were applied to pulp, peel and seeds data in order to choose the best correlation and interpretation of the experimental information.

**Table 1** – The most used models for water sorption processes in food materials

| Model                             | Equation   |
|-----------------------------------|--|
| Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) | $X_e = \frac{a b c a_w}{(1 - c a_w) [1 + (b-1) c a_w]} \quad (1)$                      |
| Oswin                             | $X_e = a \left( \frac{a_w}{(1 - a_w)} \right)^b \quad (2)$                             |
| Halsey                            | $X_e = \left( \frac{-a}{\ln(a_w)} \right)^{(1/b)} \quad (3)$                           |
| Henderson                         | $X_e = \left[ \frac{\ln(1 - a_w)}{a} \right]^{(1/b)} \quad (4)$                        |
| Lewicki                           | $X_e = a \left[ \frac{1}{(1 - a_w)^b} + \frac{1}{(1 + a_w)^c} \right]^{b-1} \quad (5)$ |
| Peleg                             | $X_e = a (a_w)^b + c (a_w)^d \quad (6)$  |

It was found the G.A.B model was the best fitting of the experimental data with regression coefficients  $R^2$  greater than 0.993. In addition, the G.A.B. model has shown to be a good model for type II isotherms [11] according to Brunauer's classification. The corresponding fit

and statistic parameters are shown in Table 2. The experimental data modelled by the GAB equation (1) is shown by the continuous line in Fig.1.

**Table 2** – Parameters of G.A.B. model for sorption of medlar fruits at 25 °C.

| <i>Sample</i> | <i>a /m.c.(d.b)<sup>-1</sup></i> | <i>b /(-)</i> | <i>c /(-)</i> | <i>R<sup>2</sup></i> |
|---------------|----------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| <b>Pulp</b>   | 0.106                            | 7.102         | 0.999         | 0.993                |
| <b>peel</b>   | 0.079                            | 5.932         | 0.947         | 0.996                |
| <b>Seed</b>   | 0.042                            | 44.82         | 0.994         | 0.993                |

Parameter a, is known as monolayer moisture content. It is referred as the optimal moisture content to prevent alterations of the quality of the product [9]. The peel has as functional role to protect the inner content of the fruit acting as a barrier to control the loose or the gain of water related to environmental conditions. Its content in ceramides and other compounds of lipid nature are responsible of a certain hydrophobic character. The equilibrium moisture content (EMC) of the peel is lower than those required for the pulp in order to keep the moisture content of the pulp. In addition, at cellular level, the soft parenchyma has a dynamic water interchange with the environment compared with the endosperm cell of the seeds. This explains the value of its monolayer moisture content when compared to peel and seeds (Table 2).

#### 4. CONCLUSIONS

The equilibrium moisture content for medlar fruits at different water activities and 25 °C was increasing in the order seeds, peel and pulp. From the sorption models studied, the GAB model showed the best fitting of the experimental data. The obtained isotherms correspond to the type II of the Brunauer's classification. The monolayer moisture content (a) obtained for each studied material was in accordance to the composition and morphological aspects mentioned. These equilibrium isotherms would serve as references for the preservation and storing of medlars fruits at 25 °C.

#### Acknowledgements

*The authors acknowledge the partial support to Xunta de Galicia with the project (PGIDIT04TAL265004PR)*

#### References

- [1] – B. Dincer, A. Colak, N. Aydin, A. Kadioglu, S. Güner – Food Chem. **77** (2002) 1
- [2] – R.H. Glew, F.A. Ayaz, C. Sanz, D.J. VanderJagt, H. Huang, L. Chuang, M. Sornad – Food Chem. **83** (2003) 363
- [3] – H. Haciseferogullari, M. Özcan, M.H. Sonmete, O. Özbek – J Food Eng. **69** (2005) 1
- [4] – J. Mataix, M. Mañas, J. Llopis – *Tabla de composición de alimentos españoles*, Universidad de Granada, Granada (1998)
- [5] – S.M. Pourmortazavi, M. Ghadiri, S.S. Hajimirsadeghi – J Food Compos. Anal. **18** (2005) 439
- [6] – R. Mohamed, M. Pineda, M. Aguilar – J Food Sci in press (2007)
- [7] – L. Campanella, A. Bonanni, G. Favero, M. Tomassetti – Anal Biochem. **375** (2003) 1011
- [8] – N. D. Menkov, A. G. Durakova, A. Krasteva– Electronic J. Env. Agric. Food Chem. (2001) (available online)
- [9] – R. Moreira, G. Vázquez, F. Chenlo – Electronic J. Env. Agric. Food Chem. (2002) (available online)
- [10] – F. Chenlo, R. Moreira, L. Chaguri, F. Santos – Cienc. Tecnol. Aliment. **5** (2005) 18
- [11] – R. Moreira, F. Chenlo, M.J. Vázquez, P. Cameán – J. Food Eng. **71** (2005) 193

## PRODUÇÃO DE NOVOS CORANTES NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

*Plácido<sup>1</sup>, A.; Teixeira<sup>1</sup>, R.; Oliveira<sup>1</sup>, J.; Faria<sup>1</sup>, A.; Miranda<sup>2</sup>, C.; Costa<sup>3</sup>, V.; Victor de Freitas<sup>1</sup>, Mateus<sup>1</sup>, N.*

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Departamento de Química (CIQ-UP)

<sup>2</sup>FRULACT, S. A.

<sup>3</sup>Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto

A produção de novos corantes naturais com características azuis, raros ao nível da gama de cores disponível na natureza, tem suscitado o interesse da indústria alimentar. A elaboração de novos produtos alimentares de cor azul apresenta uma valorização acrescida pelo facto de serem pouco comuns no mercado e porque serão rotulados como sendo naturais. A estabilidade destes corantes naturais nos produtos alimentares constitui o principal obstáculo à sua aplicação. Desta forma, foram realizados diversos testes com estabilizantes, emulsionantes e outros aditivos usados na indústria alimentar. O efeito sinérgico de alguns destes compostos permitiu formular um processo que permite a sua aplicação nos produtos alimentares. Após a realização de ensaios com diferentes iões metálicos e diferentes rácios, chegou-se à seguinte formulação: etanol, propilenoglicol, glicerol, tween 80 e sulfato de alumínio. A variação da percentagem destes compostos não alteram a cor da solução, o que pode constituir uma vantagem para a sua aplicação em diferentes produtos alimentares. (meios aquosos).

As fases principais que constituíram o projecto podem ser divididas da seguinte forma:

### *A – Fase de desenvolvimento laboratorial*

Obtenção de extractos de antocianina a partir de frutos vermelhos (mirtilo, amora e baga de sabugueiro) e produção dos respectivos extractos de derivados pirúvicos antociânicos e extractos de portisinas (pigmentos azuis) através de reacções químicas. Selecção do extracto obtido a partir do mirtilo para os ensaios a realizar em matrizes alimentares na empresa FRULACT, S. A..

### *B – Fase experimental de demonstração*

Estudo da quantidade de amostra de extracto de portisinas de mirtilo com excipiente a utilizar; Ensaios de aplicação do extracto de portisinas de mirtilo em iogurtes; Avaliação das diferentes tonalidades em função da ingredientação e características do meio, e avaliação da estabilidade do corante durante o processo de fabrico do alimento e armazenamento.

### *C – Estudo das propriedades biológicas dos novos pigmentos*

Caracterização das propriedades antioxidantes e anti-radicalares do extracto de portisinas de mirtilo..



## ÍNDICE DE AUTORES

|                                |                    |                                       |                         |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <i>Abade, E.</i> .....         | 554                | <i>Andrade, J.C.</i> .....            | 292                     |
| <i>Abreu, J.M.</i> .....       | 382                | <i>Andrade, M.H.A.T.</i> .....        | 353                     |
| <i>Abreu, M.</i> .....         | 374, 538, 627, 643 | <i>Andrade, P.B.</i> .....            | 71                      |
| <i>Afonso, C.</i> .....        | 308, 320, 487      | <i>Andrade, S.</i> .....              | 302                     |
| <i>Afonso, I.M.</i> .....      | 150                | <i>André, C.</i> .....                | 357, 489, 500, 552      |
| <i>Alegria, C.</i> .....       | 374, 538, 627, 643 | <i>António, C.</i> .....              | 489                     |
| <i>Alegrial, C.</i> .....      | 97                 | <i>Antunes, C.</i> .....              | 584                     |
| <i>Alexandre, E.M.C.</i> ..... | 520                | <i>Azevedo, J.</i> .....              | 444                     |
| <i>Alfaia, C.</i> .....        | 514                | <i>Baer, I.</i> .....                 | 373                     |
| <i>Alfaia, C.M.</i> .....      | 254, 268           | <i>Balcão, V.</i> .....               | 290                     |
| <i>Alfaia, C.M.M.</i> .....    | 272, 340, 378      | <i>Balcão, V.M.</i> .....             | 239, 431                |
| <i>Almeida, A.</i> .....       | 290                | <i>Bandarra, N.</i> .....             | 13, 67, 267             |
| <i>Almeida, A.A.</i> .....     | 353                | <i>Bandarra, N.M.</i> .....           | 19, 75, 574             |
| <i>Almeida, A.J.</i> .....     | 311                | <i>Baptista, J.</i> .....             | 77, 107, 204            |
| <i>Almeida, C.</i> .....       | 290                | <i>Baptista, P.</i> .....             | 51, 336, 436            |
| <i>Almeida, C.V.</i> .....     | 431                | <i>Barata de Carvalho, M.J.</i> ..... | 220                     |
| <i>Almeida, I.</i> .....       | 386                | <i>Barata, A.</i> .....               | 55, 312                 |
| <i>Almeida, M.</i> .....       | 260                | <i>Barbana, C.</i> .....              | 472                     |
| <i>Almeida, M.H.G.</i> .....   | 533                | <i>Barbosa, J.</i> .....              | 430                     |
| <i>Almeida, V.</i> .....       | 170                | <i>Barreto, A.S.</i> .....            | 192, 566                |
| <i>Alua, N.</i> .....          | 236                | <i>Barroca, M.J.</i> .....            | 512, 639                |
| <i>Alvarenga, N.</i> .....     | 156, 472           | <i>Barros, A.</i> .....               | 316, 554, 570           |
| <i>Alves, L.</i> .....         | 45                 | <i>Barros, A.S.</i> .....             | 138                     |
| <i>Alves, M.G.</i> .....       | 77                 | <i>Barros, L.</i> .....               | 51, 336                 |
| <i>Alves, R.</i> .....         | 59                 | <i>Barroso, M.F.</i> .....            | 358                     |
| <i>Alves, R.C.</i> .....       | 63                 | <i>Bastos, M.L.</i> .....             | 397, 436                |
| <i>Alves, S.</i> .....         | 254                | <i>Batista, A.P.</i> .....            | 13, 83                  |
| <i>Alves, S.P.A.</i> .....     | 272                | <i>Batista, I.</i> .....              | 101, 534                |
| <i>Alves, S.P.A.</i> .....     | 378                | <i>Batista, M.</i> .....              | 398                     |
| <i>Amaral, A.</i> .....        | 391                | <i>Bento, A.</i> .....                | 209, 328, 397           |
| <i>Amaral, J.S.</i> .....      | 635                | <i>Bento, F.</i> .....                | 170                     |
| <i>Amaral, O.</i> .....        | 392                | <i>Bernardo, F.</i> .....             | 386, 412                |
| <i>Anacleto, P.</i> .....      | 320                | <i>Bessa, R.J.B.</i> .....            | 254, 268, 272, 378, 514 |
| <i>Andrada, L.</i> .....       | 362, 558, 631      | <i>Bispo, P.</i> .....                | 67                      |
| <i>Andrade, A.L.</i> .....     | 77                 | <i>Bolini, H.M.A.</i> .....           | 543                     |
| <i>Andrade, A.M.</i> .....     | 75, 574            | <i>Bordado, J.C.M.</i> .....          | 367                     |
| <i>Andrade, B.A.</i> .....     | 328                | <i>Borges, M.T.M.R.</i> .....         | 543                     |

|                                     |                                      |                                    |                    |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| <i>Botelho, M.L.</i> .....          | 362                                  | <i>Cerqueira, M.A.</i> .....       | 553                |
| <i>Bouzouita, N.</i> .....          | 156                                  | <i>Chaabouni, M.M.</i> .....       | 156                |
| <i>Brandão, T.</i> .....            | 244                                  | <i>Chaso Criado, M.A.</i> .....    | 118                |
| <i>Brandão, T.R.S.</i> .....        | 520                                  | <i>Chenlo, F.</i> .....            | 647, 651           |
| <i>Bravo, M.N.</i> .....            | 496                                  | <i>Coelho, A.V.</i> .....          | 496                |
| <i>Brites, C.</i> .....             | 91, 200, 615                         | <i>Coelho, I.</i> .....            | 489, 500           |
| <i>Brito, N.V.</i> .....            | 150                                  | <i>Coelho, R.</i> .....            | 312                |
| <i>Bronze, M.R.</i> .....           | 200, 291, 404, 464, 496, 584         | <i>Coimbra, M.A.</i> .....         | 138, 166, 232, 580 |
| <i>Bulhões, S.</i> .....            | 55                                   | <i>Collar, C.</i> .....            | 615                |
| <i>Caboz, J.</i> .....              | 324                                  | <i>Cordeiro, A.R.</i> .....        | 574                |
| <i>Cabral, L.</i> .....             | 570                                  | <i>Correia, A.C.</i> .....         | 302                |
| <i>Cabrita, M.J.</i> .....          | 344, 619                             | <i>Correia, D.M.</i> .....         | 336                |
| <i>Caeiro, M.</i> .....             | 183                                  | <i>Correia, I.</i> .....           | 316                |
| <i>Caldeira, M.</i> .....           | 454, 548                             | <i>Correia, P.</i> .....           | 215, 398           |
| <i>Calhau, L.</i> .....             | 458                                  | <i>Cortinhas, L.</i> .....         | 554                |
| <i>Calhau, M.A.</i> .....           | 500                                  | <i>Cosme, V.</i> .....             | 209                |
| <i>Callejo-González, M.J.</i> ..... | 145                                  | <i>Costa e Silva, M.</i> .....     | 124                |
| <i>Calvo, M.</i> .....              | 472                                  | <i>Costa Freitas, A.M.</i> .....   | 344, 619           |
| <i>Câmara, J.S.</i> .....           | 210, 240, 324, 454, 492, 548         | <i>Costa, A.L.</i> .....           | 570                |
| <i>Campos, G.</i> .....             | 352                                  | <i>Costa, B.</i> .....             | 354                |
| <i>Campos, M.G.</i> .....           | 38                                   | <i>Costa, H.S.</i> .....           | 248                |
| <i>Canada, J.</i> .....             | 156, 178, 220, 472                   | <i>Costa, M.</i> .....             | 170, 588           |
| <i>Candeias, M.</i> .....           | 558, 631                             | <i>Costa, V.</i> .....             | 655                |
| <i>Cardo, M.</i> .....              | 386                                  | <i>Coutinho, C.</i> .....          | 13                 |
| <i>Cardoso, C.</i> .....            | 228, 267                             | <i>Coutinho, R.</i> .....          | 600, 604           |
| <i>Carvalho, F.</i> .....           | 45                                   | <i>Couto, C.</i> .....             | 292                |
| <i>Carvalho, F.</i> .....           | 623                                  | <i>Couto, C.M.C.M.</i> .....       | 354                |
| <i>Carvalho, R.</i> .....           | 368                                  | <i>Cruz, L.</i> .....              | 124                |
| <i>Casal, S.</i> .....              | 59, 63, 150, 209, 252, 294, 336, 635 | <i>Cruz, P.</i> .....              | 603                |
| <i>Castanheira, É.</i> .....        | 608                                  | <i>Cunha, E.</i> .....             | 358                |
| <i>Castanheira, I.</i> .....        | 357, 489, 500, 552                   | <i>Cunha, S.C.</i> .....           | 348                |
| <i>Castilho, M.C.</i> .....         | 33, 38, 382, 444                     | <i>Curado, T.</i> .....            | 362                |
| <i>Castro, A.R.</i> .....           | 204                                  | <i>Dapkevicius, A.</i> .....       | 25, 145, 184, 408  |
| <i>Castro, M.</i> .....             | 254, 268, 308, 436                   | <i>Dapkevicius, M.L N.E.</i> ..... | 25, 145, 184, 408  |
| <i>Castro, M.L.F.</i> .....         | 272, 340, 378                        | <i>Delerue-Matos, C.</i> .....     | 294, 358           |
| <i>Castro, S.M.</i> .....           | 526                                  | <i>Delgadillo, I.</i> .....        | 138, 316           |
| <i>Catarino, A.</i> .....           | 236                                  | <i>Dias Pereira, C.</i> .....      | 608                |
| <i>Catulo, L.</i> .....             | 404                                  | <i>Dias, J.</i> .....              | 391                |
| <i>Cavaco, T.</i> .....             | 170, 196, 219                        | <i>Dias, J.A.F.</i> .....          | 464                |

|                                     |                   |                                 |                    |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|
| <i>Dias, L.A.</i> .....             | 130               | <i>Ferreres, F.</i> .....       | 71                 |
| <i>Dias, M.G.</i> .....             | 248, 429          | <i>Ferro Palma, J.</i> .....    | 544, 588           |
| <i>Dicks, L.M.T.</i> .....          | 87                | <i>Ferro Palma, S.</i> .....    | 220                |
| <i>Diez-Diez, T.</i> .....          | 145               | <i>Figueira, A.C.</i> .....     | 196                |
| <i>Dores, J.</i> .....              | 544, 588          | <i>Figueira, A.C.O.L.</i> ..... | 219                |
| <i>DrieghE, K.</i> .....            | 607               | <i>Figueira, M.E.</i> .....     | 291                |
| <i>Dunning, N.</i> .....            | 196               | <i>Figueiredo, A.E.</i> .....   | 436                |
| <i>Duthoit, M.</i> .....            | 97, 424, 458      | <i>Figueiredo, C.</i> .....     | 302, 357           |
| <i>Eça, R.</i> .....                | 31                | <i>Fonseca, H.</i> .....        | 600, 604           |
| <i>El Omri, A.</i> .....            | 156               | <i>Fontes, C.M.G.</i> .....     | 254                |
| <i>Eliás, J.</i> .....              | 240               | <i>Fontes, T.</i> .....         | 293                |
| <i>Esquível, M.M.</i> .....         | 432               | <i>Fradinho, M.J.</i> .....     | 420                |
| <i>Esteves, M.P.</i> .....          | 45                | <i>Fradinho, P.</i> .....       | 534                |
| <i>Estevinho, L.</i> .....          | 130, 328          | <i>Fraqueza, M.J.</i> .....     | 192, 566           |
| <i>Falcão e Cunha, L.</i> .....     | 382               | <i>Frederico, C.</i> .....      | 209                |
| <i>Falco, V.</i> .....              | 554               | <i>Freire, J.</i> .....         | 67                 |
| <i>Faria, A.</i> .....              | 655               | <i>Freitas, A.M.</i> .....      | 188, 482           |
| <i>Faria, M.A.</i> .....            | 55, 312, 478      | <i>Fundo, J.</i> .....          | 244, 520           |
| <i>Faria, R.</i> .....              | 293               | <i>Galego, L.</i> .....         | 170, 491           |
| <i>Feio, S.</i> .....               | 97                | <i>Galego, L.R.</i> .....       | 562                |
| <i>Feliciano, R.</i> .....          | 200, 496, 584     | <i>Galego, P.</i> .....         | 280                |
| <i>Fernandes, H.</i> .....          | 192               | <i>Galhano, C.I.C.</i> .....    | 124                |
| <i>Fernandes, I.</i> .....          | 538, 627          | <i>Gândara, T.</i> .....        | 608                |
| <i>Fernandes, J.</i> .....          | 291, 404          | <i>García, C.</i> .....         | 112                |
| <i>Fernandes, J.O.</i> .....        | 348               | <i>Gírio, F.M.</i> .....        | 45                 |
| <i>Fernandes, M.J.</i> .....        | 192               | <i>Gisladottir, E.</i> .....    | 75                 |
| <i>Fernandes, R.M.C.S.C.</i> .....  | 118               | <i>Godinho, I.</i> .....        | 236                |
| <i>Fernando, A.</i> .....           | 440               | <i>Godinho, V.</i> .....        | 101                |
| <i>Ferraria, V.</i> .....           | 308               | <i>Godoy, H.T.</i> .....        | 32, 149, 439, 543  |
| <i>Ferreira, A.</i> .....           | 362, 558, 631     | <i>Gomes, C.J.</i> .....        | 594                |
| <i>Ferreira, D.</i> .....           | 302               | <i>Gomes, D.</i> .....          | 608                |
| <i>Ferreira, E.</i> .....           | 362, 386, 420     | <i>Gomes, J.F.P.</i> .....      | 367                |
| <i>Ferreira, H.E.C.S.</i> .....     | 367               | <i>Gomes, M.</i> .....          | 124                |
| <i>Ferreira, I.C.F.R.</i> .....     | 51, 328, 336      | <i>Gomes, M.L.</i> .....        | 558, 631           |
| <i>Ferreira, I.M.P.L.V.O.</i> ..... | 31, 250, 465, 592 | <i>Gonçalves, A.</i> .....      | 267, 575, 623      |
| <i>Ferreira, J.</i> .....           | 162               | <i>Gonçalves, C.</i> .....      | 562                |
| <i>Ferreira, M.C.</i> .....         | 192, 566          | <i>Gonçalves, E.M.</i> .....    | 374, 538, 627, 643 |
| <i>Ferreira, S.</i> .....           | 412, 432          | <i>Gonçalves, V.</i> .....      | 170                |
| <i>Ferreira-Dias, S.</i> .....      | 373               | <i>Gonzalez, C.G.</i> .....     | 178                |

|                               |                   |                                    |                              |
|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <i>Goulart, M.</i> .....      | 162               | <i>Machado, A.A.S.C.</i> .....     | 130                          |
| <i>Gouveia, C.</i> .....      | 324               | <i>Madeira, P.</i> .....           | 623                          |
| <i>Gouveia, J.M.</i> .....    | 373               | <i>Mafra, I.</i> .....             | 466                          |
| <i>Gouveia, L.</i> .....      | 13                | <i>Magalhães, S.C.F.P.</i> .....   | 482                          |
| <i>Guerra, A.</i> .....       | 290, 431          | <i>Maia, L.</i> .....              | 59                           |
| <i>Guerra, M.M.</i> .....     | 412               | <i>Malfeito-Ferreira, M.</i> ..... | 533                          |
| <i>Guimarães, H.</i> .....    | 290, 431          | <i>Mañes, J.</i> .....             | 262                          |
| <i>Guiné, R.</i> .....        | 302               | <i>Manique, R.</i> .....           | 368                          |
| <i>Guiné, R.P.F.</i> .....    | 512, 639          | <i>Mariano, G.</i> .....           | 386, 420                     |
| <i>Hendrickx, M.</i> .....    | 526               | <i>Marques, F.</i> .....           | 431                          |
| <i>Horta, M.P.</i> .....      | 362               | <i>Marques, J.C.</i> .....         | 210, 240, 324, 454, 492, 548 |
| <i>Imperatori, M.P.</i> ..... | 408               | <i>Marques, M.</i> .....           | 412, 432                     |
| <i>Jordão, A.</i> .....       | 302               | <i>Marques, P.A.</i> .....         | 188                          |
| <i>Jordão, A.M.</i> .....     | 594               | <i>Marques, S.</i> .....           | 45, 552                      |
| <i>Juan, C.</i> .....         | 262               | <i>Marreiros, S.</i> .....         | 623                          |
| <i>Jurado, A.</i> .....       | 112               | <i>Marricho, C.</i> .....          | 391                          |
| <i>Justino, J.</i> .....      | 162, 311          | <i>Martin, L.M.</i> .....          | 382                          |
| <i>Kiely, M.</i> .....        | 75                | <i>Martinez, J. A.</i> .....       | 75                           |
| <i>Ktenidou, C.</i> .....     | 219               | <i>Martins, A.</i> .....           | 162, 386                     |
| <i>Lehotay, S.J.</i> .....    | 348               | <i>Martins, C.</i> .....           | 358                          |
| <i>Leitão, A.E.</i> .....     | 558, 631          | <i>Martins, H.M.</i> .....         | 412, 430, 432                |
| <i>Leite, H.</i> .....        | 354               | <i>Martins, M.F.</i> .....         | 308, 320, 487                |
| <i>Lemos, J.P.C.</i> .....    | 260               | <i>Martins, M.R.</i> .....         | 33                           |
| <i>León, A.</i> .....         | 91                | <i>Martins, P.M.</i> .....         | 239                          |
| <i>Lima, A.D.</i> .....       | 570               | <i>Martins, R.C.</i> .....         | 488                          |
| <i>Lima, A.M.P.</i> .....     | 553               | <i>Martins, S.</i> .....           | 254                          |
| <i>Lima, E.</i> .....         | 77, 107, 204      | <i>Martins, S.I.V.</i> .....       | 272, 340, 378                |
| <i>Lino, A.R.</i> .....       | 320               | <i>Maštovská, K.</i> .....         | 348                          |
| <i>Lino, C.M.</i> .....       | 262, 368          | <i>Mataix, J.</i> .....            | 11                           |
| <i>Lopes, A.</i> .....        | 302               | <i>Mateus, N.</i> .....            | 603, 655                     |
| <i>Lopes, C.</i> .....        | 294, 374          | <i>Matos, C.</i> .....             | 290, 431                     |
| <i>Lopes, C.M.P.V.</i> .....  | 353               | <i>Matos, M.</i> .....             | 311                          |
| <i>Lopes, J.</i> .....        | 478               | <i>Matos, M.J.</i> .....           | 280                          |
| <i>Lopes, P.A.</i> .....      | 340, 378          | <i>Medina, P.L.R.</i> .....        | 118                          |
| <i>Lopes, V.V.</i> .....      | 488               | <i>Mendes, B.</i> .....            | 440                          |
| <i>Lourenço, H.M.</i> .....   | 19, 308, 320, 487 | <i>Mendes, E.</i> .....            | 150, 294                     |
| <i>Lourenço, J.A.A.</i> ..... | 374               | <i>Mendes, J.</i> .....            | 562                          |
| <i>Lourenço, M.</i> .....     | 254               | <i>Mendes, P.</i> .....            | 584                          |
| <i>Luciano, C.S.G.</i> .....  | 639               | <i>Mendes, R.</i> .....            | 228, 575                     |



|  |                             |  |                    |
|--|-----------------------------|--|--------------------|
| Mendonça, E. ....                      | 13                          | <i>Oliveira, B.</i> .....  | 63, 209, 252, 336  |
| <i>Mendonça, N.</i> .....              | 67                          | <i>Oliveira, J.</i> .....  | 655                |
| <i>Mierke-Klemeyer, S.</i> .....       | 574                         | <i>Oliveira, J.F.</i> .....  | 440                |
| <i>Miranda, C.</i> .....               | 655                         | <i>Oliveira, L.</i> .....  | 429, 454           |
| <i>Moldão-Martins, M.</i> .....        | 538, 627                    | <i>Oliveira, M.B.P.P.</i> .55, 59, 150, 294, 312, 348, 358,<br>466, 478, 635 |                    |
| <i>Molina, J.</i> .....                | 440                         | <i>Oliveira, R.G.</i> .....  | 490                |
| Monteiro, A.....                       | 444                         | <i>Oliveira, S.</i> .....  | 280                |
| <i>Monteiro, A.C.G.</i> .....          | 260                         | <i>Oliveira, L.</i> .....  | 548                |
| <i>Monteiro, M.</i> .....              | 75                          | Osório, N.....   | 93                 |
| <i>Monteiro-Moreira, A.C.O.</i> .....  | 553                         | <i>Paixão, N.</i> .....  | 210, 240, 324      |
| <i>Morais, A.M.M.B.</i> .....          | 607                         | <i>Palácios-Cabreira, H.A.</i> .....   | 490                |
| <i>Morais, L.</i> .....                | 130                         | <i>Palma, V.</i> .....   | 344, 619           |
| <i>Morais, S.</i> .....                | 294                         | <i>Parra, L.</i> .....   | 75                 |
| <i>Moreira da Silva, A.M.G.</i> .....  | 124                         | <i>Parreira, A.</i> .....  | 544, 588           |
| <i>Moreira, H.H.T.</i> .....           | 553                         | <i>Parreira, R.</i> .....  | 75                 |
| <i>Moreira, R.</i> .....               | 647, 651                    | <i>Paseiro, P.</i> .....   | 552                |
| <i>Moreira, R.A.</i> .....             | 553                         | <i>Patanita, M.</i> .....  | 544, 588           |
| <i>Moreira, S.</i> .....               | 184                         | <i>Paulo, M.C.</i> .....   | 75                 |
| <i>Mota, C.</i> .....                  | 293, 489                    | <i>Pedro, S.</i> .....   | 228                |
| <i>Mota-Filipe, H.</i> .....           | 162, 291                    | <i>Pedroso, A.</i> .....   | 293                |
| <i>Moura, P.</i> .....                 | 45                          | <i>Pena, A.</i> .....  | 262, 368           |
| <i>Moutinho, C.</i> .....              | 290                         | <i>Penacho, J.</i> .....   | 544, 588           |
| <i>Moutinho, C.G.</i> .....            | 431                         | <i>Pereira, A.</i> .....   | 31                 |
| <i>Natividade, M.</i> .....            | 544                         | <i>Pereira, C.</i> .....   | 308, 320           |
| <i>Neves, A.C.</i> .....               | 562                         | <i>Pereira, I.</i> .....   | 368                |
| <i>Noronha da Silveira, M.I.</i> ..... | 33                          | <i>Pereira, J.A.</i> .....   | 71, 209, 328, 397  |
| <i>Noronha, B.</i> .....               | 294                         | <i>Pereira, V.</i> .....   | 210, 240, 492      |
| <i>Noronha, J.</i> .....               | 608                         | <i>Peres, A.M.</i> .....   | 130                |
| <i>Noronha, J.P.</i> .....             | 311                         | <i>Peres, C.</i> .....   | 174, 404           |
| <i>Nunes da Costa, J.M.</i> .....      | 420                         | <i>Peres, M.F.</i> .....   | 174                |
| <i>Nunes, A.</i> .....                 | 316                         | <i>Perestrelo, R.</i> .....  | 240, 454, 548      |
| <i>Nunes, B.A.</i> .....               | 239                         | <i>Pérez, M.D.</i> .....   | 472                |
| <i>Nunes, C.</i> .....                 | 232                         | <i>Pestana, J.M.</i> .....   | 272                |
| <i>Nunes, E.</i> .....                 | 55, 312, 478                | <i>Petisca, C.</i> .....   | 592                |
| <i>Nunes, F.M.</i> .....               | 570, 580                    | <i>Pimentel, R.</i> .....  | 107                |
| <i>Nunes, M.C.</i> .....               | 83                          | <i>Pinheiro, C.A.</i> .....  | 386                |
| <i>Nunes, M.L.</i> .....               | 19, 228, 308, 320, 487, 574 | <i>Pinheiro, H.</i> .....  | 432                |
| <i>Oehlenschlager, J.</i> .....        | 574                         | <i>Pinheiro, J.</i> .....  | 374, 538, 627, 643 |
| <i>Oliveira, A.R.</i> .....            | 118, 224                    |  |                    |

|                                     |                              |                                  |               |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|
| <i>Pinho, O.</i> .....              | 31, 250, 465, 592            | <i>Rodrigues, A.</i> .....       | 67            |
| <i>Pinho, S.M.</i> .....            | 512                          | <i>Rodrigues, F.</i> .....       | 454, 548      |
| <i>Pintado, C.</i> .....            | 404                          | <i>Rodrigues, I.T.</i> .....     | 514           |
| <i>Pintado, C.J.M.</i> .....        | 174                          | <i>Rodrigues, M.</i> .....       | 368           |
| <i>Pinto, I.</i> .....              | 354                          | <i>Rodrigues, V.</i> .....       | 38            |
| <i>Pinto, M.</i> .....              | 386, 420                     | <i>Romano, C.</i> .....          | 398           |
| <i>Pinto, P.</i> .....              | 398                          | <i>Roque, A.C.</i> .....         | 31            |
| <i>Pires, C.</i> .....              | 101                          | <i>Roseiro, L.B.</i> .....       | 97, 424       |
| <i>Pires, R.</i> .....              | 533                          | <i>Rosell, C.M.</i> .....        | 615           |
| <i>Plácido, A.</i> .....            | 655                          | <i>Rosenberger, M.</i> .....     | 492           |
| <i>Pocovi, C.</i> .....             | 472                          | <i>Rybka, A.C.P.</i> .....       | 32            |
| <i>Pontes, M.</i> .....             | 210                          | <i>Saldanha, C.</i> .....        | 412           |
| <i>Portugal, A.</i> .....           | 254                          | <i>Sales, M.G.</i> .....         | 358           |
| <i>Prado, M.A.</i> .....            | 32, 149, 439, 490, 543       | <i>Sampaio, P.</i> .....         | 250           |
| <i>Prates, J.A.M.</i> .....         | 254, 268, 272, 340, 378, 514 | <i>San Romão, M.V.</i> .....     | 464           |
| <i>Quaresma, M.</i> .....           | 254                          | <i>Sanches-Silva, A.T.</i> ..... | 552           |
| <i>Quaresma, M.A.G.</i> .....       | 514                          | <i>Sánchez, L.</i> .....         | 472           |
| <i>Queiroz, P.C.</i> .....          | 449                          | <i>Santiago, S.</i> .....        | 357           |
| <i>Quintas, M.</i> .....            | 244                          | <i>Santos Dias, B.</i> .....     | 298, 332      |
| <i>Ramos, A.C.</i> .....            | 558, 631                     | <i>Santos Oliveira, J.</i> ..... | 220           |
| <i>Ramos, F.</i> .....              | 33, 38, 444                  | <i>Santos, C.</i> .....          | 215, 354, 615 |
| <i>Rauter, A.P.</i> .....           | 162, 311                     | <i>Santos, D.</i> .....          | 150           |
| <i>Ravasco, F.</i> .....            | 424, 458                     | <i>Santos, D.M.</i> .....        | 520           |
| <i>Raymundo, A.</i> .....           | 13, 83, 93                   | <i>Santos, J.</i> .....          | 570           |
| <i>Rebelo, C.S.</i> .....           | 416                          | <i>Santos, J.A.</i> .....        | 603           |
| <i>Reis, A.</i> .....               | 55                           | <i>Santos, J.P.</i> .....        | 487           |
| <i>Reis, S.F.A.R.</i> .....         | 138                          | <i>Santos, L.H.L.M.</i> .....    | 465           |
| <i>Ribeiro, A.</i> .....            | 444                          | <i>Santos, M.</i> .....          | 248, 293, 354 |
| <i>Ribeiro, A.T.</i> .....          | 101                          | <i>Santos, P.</i> .....          | 192           |
| <i>Ribeiro, M.</i> .....            | 431                          | <i>Santos, R.A.</i> .....        | 490           |
| <i>Ribeiro, P.J.L.</i> .....        | 268                          | <i>Sapata, M.</i> .....          | 362           |
| <i>Ribeiro, V.</i> .....            | 254                          | <i>Sapata, M.M.</i> .....        | 558, 631      |
| <i>Rocha, A.</i> .....              | 130                          | <i>Saraiva, D.</i> .....         | 33            |
| <i>Rocha, A.M.C.N.</i> .....        | 607                          | <i>Saraiva, J.</i> .....         | 526, 576      |
| <i>Rocha, G.</i> .....              | 290, 431                     | <i>Saraiva, S.</i> .....         | 232           |
| <i>Rocha, J.</i> .....              | 55, 291                      | <i>Saramago, A.</i> .....        | 1             |
| <i>Rocha, S.M.</i> .....            | 138, 166                     | <i>Scherer, R.</i> .....         | 32            |
| <i>Rodrigues da Silva, L.</i> ..... | 276, 286, 298, 332, 416, 608 | <i>Seabra, R.</i> .....          | 635           |
| <i>Rodrigues, I.</i> .....          | 576                          | <i>Seabra, R.M.</i> .....        | 71, 328       |

|                                |                    |                                |                   |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------|
| <i>Sepodes, B.</i> .....       | 291                | <i>Sousa, M.B.</i> .....       | 362               |
| <i>Serra, M.C.</i> .....       | 236                | <i>Takemoto, E.</i> .....      | 149, 439          |
| <i>Serralheiro, L.</i> .....   | 162                | <i>Tavares, P.</i> .....       | 31                |
| <i>Silva Rebelo, C.</i> .....  | 276, 286           | <i>Teixeira, A.</i> .....      | 386, 444          |
| <i>Silva, C.</i> .....         | 244, 324, 647, 651 | <i>Teixeira, J.A.</i> .....    | 553               |
| <i>Silva, C.C.G.</i> .....     | 25, 145, 184, 408  | <i>Teixeira, L.</i> .....      | 302               |
| <i>Silva, C.L.M.</i> .....     | 520                | <i>Teixeira, R.</i> .....      | 655               |
| <i>Silva, F.</i> .....         | 162                | <i>Temudo, S.</i> .....        | 83                |
| <i>Silva, G.</i> .....         | 107                | <i>Teves, Z.</i> .....         | 77                |
| <i>Silva, H.F.A.</i> .....     | 280                | <i>Thorsdottir, I.</i> .....   | 75                |
| <i>Silva, I.</i> .....         | 166                | <i>Todorov, S.D.</i> .....     | 87                |
| <i>Silva, J.</i> .....         | 294                | <i>Torres, M.</i> .....        | 344, 619          |
| <i>Silva, L.J.G.</i> .....     | 262                | <i>Tovar, J.</i> .....         | 112               |
| <i>Silva, L.R.</i> .....       | 600, 604           | <i>Trigo, M.J.</i> .....       | 91, 200, 362, 615 |
| <i>Silva, N.A.F.</i> .....     | 280                | <i>Tuna, J.M.F.</i> .....      | 353               |
| <i>Silva, P.</i> .....         | 623                | <i>Valentão, P.</i> .....      | 71, 328           |
| <i>Silva, S.</i> .....         | 291, 404, 444, 496 | <i>Vallejo, N.</i> .....       | 647               |
| <i>Silva, S.A.</i> .....       | 466                | <i>Van Loey, A.</i> .....      | 526               |
| <i>Silveira, I.</i> .....      | 368                | <i>Vasconcellos, F.</i> .....  | 558, 631          |
| <i>Silveira, M.I.</i> .....    | 382, 444           | <i>Vaz-Freire, L.</i> .....    | 188, 482          |
| <i>Silveira, M.I.N.</i> .....  | 38                 | <i>Vaz-Velho, M.</i> .....     | 87                |
| <i>Silvestre, A.J.D.</i> ..... | 580                | <i>Vega, A.</i> .....          | 440               |
| <i>Simões, J.A.</i> .....      | 260                | <i>Veloso, M.G.</i> .....      | 362               |
| <i>Smout, C.</i> .....         | 526                | <i>Ventanas, J.</i> .....      | 178               |
| <i>Soares, E.</i> .....        | 397                | <i>Vicente, A.A.</i> .....     | 488, 504, 553     |
| <i>Soares, M.E.</i> .....      | 436                | <i>Victor de Freitas</i> ..... | 603, 655          |
| <i>Sousa, A.</i> .....         | 209, 328           | <i>Viegas, T.</i> .....        | 444               |
| <i>Sousa, C.</i> .....         | 71                 | <i>Vilas Boas, L.</i> .....    | 464, 496          |
| <i>Sousa, J.R.</i> .....       | 354                | <i>Vital, A.</i> .....         | 352, 424          |

