



**Avaliação da Capacidade Antioxidante e da Estabilidade Após
Embalamento a Vácuo de Hambúrgueres de Pata-roxa
(*Scyliorhinus canicula*).**

Joana Filipa Ferreira Patriarca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Maria José Rodrigues e
co-orientação do Doutor Rui Pedrosa.

2014

Título: Avaliação da Capacidade Antioxidante e da Estabilidade Após Embalamento em Vácuo de Hambúrgueres de Pata-roxa (*Scylliorhinus canicula*).

Copyright © Joana Filipa Ferreira Patriarca

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2014

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

Ao Futuro que começa agora,
Ao Desperdício que não conseguimos impedir,
A Todos que se esforçam para fazer a diferença.

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho de investigação apenas foi possível devido à colaboração de várias pessoas, a quem devo um sincero obrigado:

Aos professores Maria José Rodrigues e Rui Pedrosa, pela orientação, espírito crítico e conhecimentos científicos transmitidos ao longo de todo o trabalho.

À professora Susana Mendes e aos mestres Celso Alves e Susete Pinteus, pela infinita paciência para responder às minhas dúvidas e por todos os conselhos e sugestões que me deram para melhorar o meu trabalho e desempenho.

À Márcia Caramalho, pelo apoio que me permitiu melhorar a minha experiência na microbiologia alimentar.

Aos elementos do Grupo de Investigação em Recursos Marinhos e aos meus colegas de mestrado em Biotecnologia Aplicada pelo companheirismo, motivação e ajuda que me deram, direta ou indiretamente.

Ao Paulo Tavares e à Cláudia Coelho, pelo ombro amigo quando precisei.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e irmã, pela compreensão e apoio incondicional durante esta etapa do meu percurso académico, principalmente nos momentos mais difíceis.

O trabalho de investigação realizado foi financiado e desenvolvido no âmbito do projeto GAC Oeste integrado no Fundo Europeu das Pescas.



Até ao momento, do presente trabalho resultou uma comunicação em póster num congresso internacional.

Comunicação em póster:

- Patriarca, P., Rodrigues, M.J., Pedrosa, R. (2014). *Antioxidant Small-spotted Catshark (Scyliorhinus canicula) Burgers*. International Meeting on Marine Resources, 10-11 de Julho, Peniche, Portugal.

Resumo

Toneladas de pescado são desperdiçadas diariamente aquando do processamento do peixe e o hambúrguer de pata-roxa foi desenvolvido para reaproveitar esse pescado subvalorizado e para ser uma fonte nutricional rica em antioxidantes. No presente trabalho, pretendeu-se comprovar o potencial antioxidante antes e após o tratamento térmico do hambúrguer de pata-roxa, e o potencial citotóxico e antiproliferativo sobre um modelo celular do cancro da mama (MCF-7). Foi também observada a estabilidade do hambúrguer de pata-roxa embalado a vácuo e refrigerado.

A extração dos compostos fitoquímicos foi realizada com solventes de polaridade distinta (água, metanol e diclorometano) e com diferentes durações do processo (12h e 24h). O tratamento térmico aplicado foi vinte minutos a 180°C. O potencial antioxidante foi avaliado pela capacidade de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e pela capacidade de redução de radicais de oxigénio (ORAC), e através da quantificação total de polifenóis (QTP) pelo método de Folin-Ciocalteu (FC). O potencial citotóxico e antiproliferativo foi avaliado na linha celular MCF-7, cujos resultados foram revelados por ensaios espectrofotométricos (método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)) e fluorimétricos (método de acetoxi-metil éster de calceína (calceína-AM)). A estabilidade do hambúrguer de pata-roxa em vácuo e refrigerado foi avaliada através do estudo microbiológico com metodologias de referência (contagens de “totais” e produtores de sulfureto de hidrogénio (H₂S) aeróbios e anaeróbios, esporos de *Clostridium* sulfitos-redutores, enterobactérias, *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.), da determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) e da avaliação da cor do hambúrguer pelo sistema CIE-L*a*b*.

Os ensaios de DPPH e ORAC comprovaram a atividade antioxidante do extrato de hambúrguer de pata-roxa (metanol, 12h) com 79,5% de redução do DPPH e 8603,01µmol ET/100g para amostras sem tratamento térmico, e 87,4% de redução do DPPH e 2567,27µmol ET/100g para amostras com tratamento térmico. Quanto ao conteúdo fenólico, os extratos (metanol, 12h) revelaram 17,13mg EAG/100g do hambúrguer cru e 31,81mg EAG/100g do hambúrguer cozinhado. A extração de 24 horas não aumentou a quantidade de compostos fitoquímicos presentes no extrato. O hambúrguer apenas revelou ainda um potencial citotóxico *in vitro* relevante na linha celular MCF-7 (1mg/mL, 24h).

Apesar do abuso observado na temperatura de armazenamento em refrigeração (temperatura média de 10,3°C), o hambúrguer de pata-roxa cru, quando submetido ao embalamento a vácuo, apresentou um aumento no período de vida útil de prateleira de 4 dias relativamente à pata-roxa. Foi detetada a presença de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores e $1,0 \times 10^1$ ufc *E. coli* por 1g de hambúrguer de pata-roxa. Não foi detetada a presença de *Salmonella* spp. O índice de TBA manteve-se estável, mas o hambúrguer de pata-roxa sofreu uma perda na vivacidade (C_{ab}) e na tonalidade (h_{ab}) da cor ao fim de 6 dias em refrigeração.

É necessário continuar o estudo para melhorar o novo produto alimentar funcional, mas o presente trabalho permitiu concluir que o hambúrguer de pata-roxa reúne as condições para ter um elevado potencial antioxidante, apresentar maior estabilidade em armazenamento e, em simultâneo, constituir uma solução para o desperdício de pescado.

Palavras-chave: Pata-roxa; ORAC; MCF-7; Tempo de Vida Útil de Prateleira; Cor; Índice de TBA.

Abstract

Tons of fish are rejected daily, not only on board, but also on shore during the industrial processing. In an attempt to reuse by-catch fish and to provide a rich nutrition source of antioxidant compounds, the small spotted catshark burger was developed. In the present work, the antioxidant potential was determined for raw and cooked small spotted catshark burgers. The cytotoxicity and antiproliferative potentials were also verified in a breast cancer cell line (MCF-7). Under vacuum small spotted catshark burger's shelf life was evaluated.

Solvents with different polarities (water, methanol and dichloromethane) and different extraction times (12h and 24h) were used to extract phytochemical compounds from raw and cooked small spotted catshark burger. The heat treatment consisted in twenty minutes at 180°C. The antioxidant potential was evaluated by scavenging of DPPH free radical assay, oxygen radical antioxidant capacity assay (ORAC) and total polyphenol content quantification by Folin-Ciocalteu method. The cytotoxicity and antiproliferative potential results were obtained through 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and calcein-AM methods, respectively. The food quality and safety of refrigerated under vacuum small spotted catshark burger was evaluated through a microbiological study with reference methodologies, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, and color changing by the CIE-L*a*b* system.

Methanolic extract (12h) of raw small-spotted catshark burger has 79.5% of capacity to reduce DPPH activity and 8603.01µmol ET/100g while methanolic extract (12h) of cooked burgers has 87.4% of capacity to reduce DPPH activity and 2567.27µmol ET/100g of antiradical activity. Regarding phenolic content, it was detected 17,13mg GAE/100g and 31.81mg GAE/100g for raw and cooked burgers extracts (methanol, 12h), respectively. The 24-hour extractions didn't increase the amount of extracted phytochemicals compounds. Methanolic extracts of raw and cooked burgers at 1mg/mL were only able to have a relevant *in vitro* cytotoxicity potential on MCF-7 line cell.

Even with a temperature abuse (average temperature of 10.3°C) under vacuum storage, raw small-spotted catshark burger presented four extra days of shelf life than small-spotted catshark. It was detected sulphite-reducing *Clostridium* spores and 1,0x10¹ufc *E. coli* per gramme of burger. *Salmonella* spp. was not detected. TBARS

values didn't vary significantly while the orange characteristic burger' color changed because of loss of vivacity (C_{ab}) and hue (h_{ab}) during the vacuum storage.

It's necessary to keep researching to improve this new functional fish product, but the present work has showed that the small-spotted catshark burger has a relevant antioxidant potential, a longer stability during storage and at the same time it's a solution for the waste of fish.

Keywords: Small-spotted catshark; ORAC; DPPH; MCF-7; Shelf-life; Color; TBARS.

Índices

Índice Geral

Resumo	xi
Abstract	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Desperdício e subvalorização de pescado	3
1.1.1. Pata-roxa (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	4
1.2. A dieta como fator de risco de doença.....	4
1.2.1. O cancro.....	5
1.3. <i>Stress</i> oxidativo.....	6
1.4. A importância dos compostos antioxidantes	7
1.4.1. Alimentos com potencial antioxidante, anticancerígeno e antibacteriano .	7
1.4.2. Natureza de compostos fitoquímicos.....	8
1.5. Alimentos funcionais	9
1.6. Avaliação da capacidade antioxidante e dos efeitos citotóxico e antiproliferativo	10
1.7. Avaliação da deterioração e segurança de alimentos.....	10
1.8. Objetivos	11
1.8.1. Objetivos gerais	11
1.8.2. Objetivos específicos	12
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Confeção do hambúrguer de pata-roxa	15
2.1.2. Tratamento Térmico	16
2.2. Processo de extração	16
2.3. Avaliação da capacidade antioxidante	16
2.3.2. Redução do radical livre DPPH.....	16
2.3.3. Quantificação total de polifenóis.....	17
2.3.4. Avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigénio	18
2.4. Avaliação citotóxica e antiproliferativa	18
2.4.1. Manutenção e preparação da cultura MCF-7	18
2.4.2. Ensaio de viabilidade celular e proliferação celular	19
2.5. Avaliação da estabilidade após embalagem a vácuo	20
2.5.1. Estudo microbiológico.....	20
2.5.2. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico.....	25
2.5.3. Leitura da Cor	25
2.6. Análise estatística	26
3. Resultados	29
3.1. Hambúrguer de pata-roxa sem tratamento térmico.....	31

3.1.1.	Avaliação da capacidade antioxidante.....	31
3.1.2.	Avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativo	37
3.2.	Hambúrgueres de pata-roxa com tratamento térmico	41
3.2.1.	Avaliação da capacidade antioxidante.....	41
3.2.2.	Avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativo	43
3.3.	Avaliação da estabilidade após embalagem a vácuo	46
3.3.1.	Estudo microbiológico.....	46
3.3.2.	Índice de TBA	51
3.3.3.	Leitura da Cor	52
4.	Discussão	55
4.1.	Capacidade antioxidante e efeito citotóxico e antiproliferativo nas células MCF-7.....	57
4.2.	Estabilidade após embalagem a vácuo.....	63
5.	Conclusão	69
6.	Perspetivas futuras.....	73
7.	Bibliografia	77

Índice de Figuras

- Figura 1 - Capacidade de redução do radical DPPH dos extratos a 1mg/mL obtidos a partir de hambúrguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*). 31
- Figura 2 - Capacidade de redução do radical DPPH dos extratos de hambúrguer a 1mg/mL obtidos com diferentes solventes após diferentes tempos de extração (12h e 24h). Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=3). 32
- Figura 3 - Dependência da concentração (10-1000 μ g/mL) dos extratos de hambúrguer obtidos com A) metanol, B) metanol aquoso e C) metanol e diclorometano após 12h e 24h de extração, que reduziram a atividade do radical DPPH em mais do que 50% a uma concentração de 1mg/mL. CT: controlo. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=12). 33
- Figura 4 - Quantificação total de polifenóis dos extratos obtidos a partir de hambúrguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*). 35
- Figura 5 - Quantificação total de polifenóis dos extratos obtidos de hambúrgueres de pata-roxa após 12h e 24h de extração com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). 35
- Figura 6 - Capacidade de redução de radicais peróxido dos extratos obtidos a partir de hambúrguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*). # $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres (ANOVA). 36
- Figura 7 - Capacidade de redução de radicais peróxido dos extratos obtidos de hambúrgueres de pata-roxa após 12h e 24h de extração com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). # $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres obtidos após 12h de extração (ANOVA). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres obtidos após 24h de extração (ANOVA). 37
- Figura 8 - Efeito citotóxico dos diferentes extratos de hambúrguer e de pata-roxa (1mg/mL) sobre a viabilidade celular das células MCF-7 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos dos hambúrgueres em relação ao controlo (*t-student*). 38
- Figura 9 - Efeito citotóxico dos extratos de hambúrguer de pata-roxa a diferentes concentrações de (10-100 μ g/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação.

- Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8)..... 39
- Figura 10 - Efeito antiproliferativo dos extratos de hambúrguer e de pata-roxa (1mg/mL) sobre a viabilidade celular das células MCF-7 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos do hambúrguer em relação ao controlo (*t-student*). # $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas entre os diferentes extratos de hambúrguer de pata-roxa (ANOVA)..... 40
- Figura 11 - Efeito antiproliferativo dos extratos de hambúrguer nas concentrações de 10, 30 e 100 μ g/mL nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8)..... 41
- Figura 12 - Capacidade de redução do radical DPPH (% do controlo), QTP (mg EAG/100g amostra) e ORAC (μ mol ET/100g amostra) dos extratos metanólicos a 1mg/mL de hambúrgueres crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas para o hambúrguer cozinhado em relação ao hambúrguer cru (*t-student*)..... 42
- Figura 13 - Dependência da concentração (10-1000 μ g/mL) dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa A) crus e B) cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração, que reduziram a atividade do radical DPPH em mais do que 50% a uma concentração de 1mg/mL. CT: controlo. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=12). 43
- Figura 14 - Atividades citotóxica e antiproliferativa dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a 1mg/mL em células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM e do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=12). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos de hambúrguer em relação ao controlo (*t-student*)..... 44
- Figura 15 - Efeito citotóxico dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a diferentes concentrações (10-100 μ g/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8)..... 45
- Figura 16 - Efeito antiproliferativo dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a diferentes concentrações (10-100 μ g/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8). 45
- Figura 17 – Contagens (C.) de microrganismos aeróbios “totais” e degradativos incubados a uma temperatura média de 22,2°C [21,50°C; 24,10°C] durante 3 dias presentes na pata-roxa e no hambúrguer ao longo do tempo. O limite máximo aceite de microrganismos aeróbios presentes nas amostras foi 10⁷ ufc/g. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, *t-student*) nas

contagens de microrganismos aeróbios “totais” e degradativos entre as amostras para os tempos 0, 2, 4 e 6 dias.....	47
Figura 18 – Contagens (C.) de microrganismos anaeróbios “totais” e degradativos incubados a uma temperatura média de 22,2°C [21,50°C; 24,10°C] durante 3 dias presentes na pata-roxa e no hambúrguer durante 2 e 6 dias de refrigeração, respetivamente. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas nas contagens de microrganismos anaeróbios “totais” e degradativos, entre as amostras, para os tempos 0 e 2 dias ($p \leq 0,05$, <i>t-student</i>).....	48
Figura 19 - Crescimento de enterobactérias a 30°C durante 24h presentes na pata-roxa e no hambúrguer em refrigeração ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Para os tempos 0 e 2 dias, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras ($p \geq 0,05$, <i>t-student</i>).	49
Figura 20 - Variação do índice de TBA da pata-roxa e do hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias de refrigeração, respetivamente. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=4). O índice de TBA não variou significativamente ao longo do tempo ($p \geq 0,05$, ANOVA). Para os tempos 0 e 2 dias, existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras ($p \leq 0,05$, <i>t-student</i>).....	52
Figura 21 - Variação da cor de A) pata-roxa e de B) hambúrguer de pata-roxa quando embalados a vácuo e armazenados em refrigeração durante 2 e 6 dias, respetivamente.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores médios de EC ₅₀ [min; máx] (n=12) para os extratos dos hambúrgueres sem tratamento térmico que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH superior a 50%. (1mg/mL).	34
Tabela 2 - Valores médios de EC ₅₀ [min; máx] (n=12) para os extratos obtidos a partir de hambúrgueres crus e cozinhados que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH superior a 50%.	43
Tabela 3 -Valores de humidade em percentagem para a pata-roxa e para o hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Os valores correspondem à média ± SEM (n=2).	51
Tabela 4 - Valores de L*, a* e b* para a pata-roxa e para o hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Os valores correspondem à média ± SEM (n=12).	53
Tabela 5 - Parâmetros da leitura da cor para a pata-roxa e para o hambúrguer determinados a partir dos valores de L*, a* e b*. Os valores correspondem à média ± SEM (n=12).	53
Tabela 6 - Valores QTP (mínimos e máximos) de referência para cada ingrediente utilizado para a confeção de 100g de hambúrguer de pata-roxa.	59
Tabela 7 - Valores ORAC (mínimos e máximos) de referência para cada ingrediente utilizado para a confeção de 100g de hambúrguer de pata-roxa.	60

Abreviaturas e Símbolos

As abreviaturas e símbolos utilizados são aqui apresentados por ordem alfabética seguidos da correspondente definição. As abreviaturas são também explicadas (entre parêntesis) a primeira vez que aparecem no texto.

Abreviatura/Símbolo	Definição
%	Porcentagem
°	Graus
±	Mais ou menos
≤	Sinal de menor ou igual
≥	Sinal de maior ou igual
≈	Aproximadamente
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
¹ O ₂	Oxigénio singleto
AAPH	2, 2-azobis (2-aminopropano) dihidroclorato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCP	Bromcresol Purple
BPW	Buffered peptone water
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
C ₄ H ₇ NaO ₂	Butirato de sódio
C _{ab}	Saturação da cor
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
calceína-AM	Acetoxi-metil éster de calceína
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC ₅₀	Concentração que reduz a atividade do radical livre em 50%
ET	Equivalentes de Trolox
<i>et al</i>	E outros
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Folin-Ciocalteu
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
H ₂ S	Sulfureto de hidrogénio
h _{ab}	Tonalidade da cor

HO [•]	Hidróxilo
ISO	International Organization for Standardization
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KIA	Kligler Iron Agar
máx	Máximo
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA	Malondialdeído
MEM	Modified Eagle Medium
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
min	Mínimo
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MRD	Maximun Recovery Diluent
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
N ₂	Azoto
NA	Nutrient Agar
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
Na ₂ SO ₃	Sulfito de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanómetros
NO [•]	Monóxido de azoto
NO ₂ [•]	Dióxido de azoto
NP	Norma portuguesa
O ₂	Oxigénio
O ₂ ^{•-}	Superóxido
°C	Graus Celcius
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p	Nível de significância
rad	Radianos
RH	Ácidos gordos polinsaturados
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROO [•]	Peróxilo
ROOH	Hidroperóxidos lipídicos
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RVS	Rappaport Vassiliadis Soja
SE	Salmonella Express
SEM	Erro-padrão da média
SMID	Salmonella Detection and Identification

SPS	Sulfite Polymyxin Sulfadiazine
spp	Espécies indefinidas
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide
ufc	Unidades formadoras de colónias
XLD	Xylose lysine deoxycholate agar
α	Alfa
β	Beta
ΔE	Diferença total da cor

Introdução

O pescado é um alimento com um teor nutricional elevado, sendo rico em proteínas, em vitaminas e uma fonte importante de ácidos gordos insaturados, que não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Como tal, desempenha um papel fundamental na alimentação e prevenção de doenças (Ababouch, 2005a). No entanto, o pescado subvalorizado é desperdiçado diariamente em grandes quantidades, por todo o mundo (INE, 2012). Este facto aliado ao conhecimento de que uma nutrição equilibrada ajuda a prevenir o surgimento de doenças, incluindo o cancro, impulsionou o desenvolvimento de um produto alimentar à base de pescado subvalorizado desperdiçado com ingredientes de ação antioxidante comprovada que podem intervir na saúde do consumidor e no período de tempo de vida útil de prateleira de um produto alimentar (Donaldson, 2004).

1.1. Desperdício e subvalorização de pescado

Todos os anos, milhares de toneladas de pescado são desperdiçadas em todo o mundo (INE, 2012). No Atlântico e no Mediterrâneo, em 2012, o excesso de pesca, relativamente à necessidade local, atingiu valores na ordem dos 39% e 88% de pesca excessiva, respetivamente (Vulperhorst *et al.*, 2013). Em Portugal Continental, foram rejeitadas em terra 341 toneladas de pescado só em 2011. Deste desperdício, 13 toneladas deveram-se à atividade da inspeção sanitária e as restantes 326 toneladas ocorreram devido à impossibilidade de comercialização do produto pescado, sendo 43 toneladas correspondentes a pescado rejeitado no porto de Peniche (INE, 2012).

O desperdício de pescado verificado a nível mundial, todos os anos, encontra-se associado (i) ao interesse de capturar somente peixe de alto valor comercial, (ii) à captura e manuseamento deficientes que depreciam fisicamente o pescado, diminuindo o seu valor comercial, (iii) ao facto de não existir mercado para certas espécies que são capturadas durante o arrasto, e (iv) à captura de pescado de idade e/ou comprimento cuja venda é ilegal (Ababouch, 2005b; OCEANA, 2011; Vulperhorst *et al.*, 2013; Keledjian, 2014). Para o combater, foram propostas várias opções para a sua valorização, nomeadamente i) a produção de óleo de peixe e refeições à base de pescado, ii) a extração de potenciais compostos de interesse para as áreas como a farmacêutica e a cosmética, e iii) a suplementação de produtos alimentares quer por aplicação direta, quer através da produção de polpa de peixe (Pazo *et al.*, 2014).

1.1.1. Pata-roxa (*Scyliorhinus canicula*)

A pata-roxa é uma espécie de tubarão frequente no mar Mediterrâneo e a nordeste no oceano Atlântico desde Portugal até à Noruega, incluindo a costa britânica (Trust, 2011). Trata-se de um exemplo de pescado com valor comercial muito baixo (DGRM, 2014), sendo considerada uma praga pelos pescadores (Trust, 2009). Comparativamente com a sardinha (13,6% de teor máximo de lípidos no Verão), a pata-roxa é um peixe mais magro, mesmo na época da Primavera (2,7% de teor lipídico), quando tem mais alimento disponível (García-Moreno *et al.*, 2013).

Uma percentagem superior a 80% da captura é devolvida ao mar (Carbonell *et al.*, 2002; Rodríguez-Cabello *et al.*, 2005) e é uma espécie categorizada como estando fora de perigo de extinção (Trust, 2014). Em terra, a rejeição pode variar entre os 15% a 60%, dependendo da espécie-alvo das frotas portuguesas (Fernandes *et al.*, 2008). Quando descarregada nas lotas, é frequentemente aproveitada como isco (Trust, 2009) ou para produzir óleo de peixe (García-Moreno *et al.*, 2013), mas é muito pouco procurada para consumo (Trust, 2009). Tendo uma taxa de sobrevivência superior a 90% quando devolvida ao mar, a pata-roxa pode torna-se uma espécie oportunista (Revill *et al.*, 2005). A pesca excessiva tem vindo a empobrecer a população das espécies com grande valor comercial, permitindo que outras espécies proliferem (como a da pata-roxa), desequilibrando os ecossistemas marinhos. Indiretamente revela a importância de valorizar espécies de baixo valor comercial para não sobrecarregar aquelas que rapidamente ficam em vias de extinção devido à grande procura que se verifica nos países desenvolvidos (Molfese *et al.*, 2014).

1.2. A dieta como fator de risco de doença

Apesar do pescado ser uma fonte nutricional de elevada importância (Ababouch, 2005b), milhares são os indivíduos que não o consomem e que seguem uma alimentação inapropriada, correndo o risco de malnutrição e de contraírem doenças graves. A obesidade é um exemplo de um fator de risco que pode despoletar certos tipos de cancro (nomeadamente, cancro na mama, no esófago, na tiroide ou nos rins; NCI, 2012), doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais (AVC) ou diabetes (PHAC, 2011). A probabilidade de contrair cancro aumenta mais de 30% quando não existe uma alimentação equilibrada (Béliveau e Gingras, 2006), sendo 14% associados à falta de frutas e vegetais (WHO, 2009). O consumo excessivo de gordura, açúcares e de produtos de carne, que caracteriza a dieta da maioria dos

países desenvolvidos, está diretamente relacionado com o número crescente de casos de cancro na Europa e na América (Key *et al.*, 2004; ACS, 2010; ACS, 2012, ACS, 2014).

1.2.1. O cancro

O cancro é uma condição patológica caracterizada pela proliferação celular excessiva e pela indução insuficiente do mecanismo de morte celular programada (apoptose) (Kuno *et al.*, 2012). A população idosa tem maior probabilidade de contrair esta doença (77% acima dos 55 anos) (ACS, 2012; Steliarova-Foucher *et al.*, 2012), mas a incidência desta doença sobre crianças e adolescentes tem vindo a aumentar por todo o mundo (ACS, 2014; Cancer Research UK, 2014; Siegel *et al.*, 2014).

No caso específico de Portugal, trata-se de uma das principais causas de morte, tendo sido estimados cerca de 492 mil casos novos de cancro e 241 mil mortes associadas para 2012 (Ferlay *et al.*, 2013b). As mulheres são mais afectadas pelo cancro da mama (60,9 mil casos novos e 15,7 mil mortes estimados para 2012) e do intestino (29,2 mil casos novos e 15,6 mil mortes estimados para 2012). Os homens são mais afectados pelo cancro do intestino (42,1 mil casos novos e 22,4 mil mortes estimados para 2012), da próstata (66,2 mil casos novos e 15,8 mil mortes estimados para 2012), do pulmão (32,1 mil casos novos e 26,4 mil mortes estimados para 2012) e do estômago (18,3 mil casos novos e 13,9 mil mortes estimados para 2012) (La Vecchia *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012; Ferlay *et al.*, 2013b). É uma doença dispendiosa, quer a nível pessoal, quer a nível nacional. Para além de acarretar elevados custos associados para o sistema de saúde (43 milhões de euros, em 2009), também afeta a produtividade do trabalho nacional (perdas de 98 milhões de euros devido à doença e mais de 1 bilião de euros devido à morte prematura, em 2009) e as despesas de amigos e familiares em cuidados prestados (uma estimativa de 268 milhões de euros, em 2009) (Luengo-Fernandez *et al.*, 2013).

Infelizmente, o número de novos casos de cancro não mostra tendência para parar de aumentar. Foram previstos 14 milhões de novos casos por todo o mundo para 2014 e foi estimado que, em 2034, haverá um aumento de 36,4% de casos de cancro (Stewart e Wild, 2014). A população portuguesa pode vir a sofrer um aumento de 22,9% de novos casos até 2035 (Ferlay *et al.*, 2013a).

1.3. Stress oxidativo

Quer se aborde o cancro, doenças inflamatórias ou doenças cardiovasculares, estas e outras doenças possuem em comum o facto do *stress* oxidativo ter um papel crucial para o seu desenvolvimento (Lobo *et al.*, 2010). O *stress* oxidativo é o resultado da produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e de azoto (*Reactive Nitrogen Species* - RNS) presentes no meio intracelular (Kryston *et al.*, 2010), e da deficiência no sistema de defesa antioxidante (Jayakumar e Kanthimathi, 2012; Pinchuk *et al.*, 2012). Alguns exemplos de ROS são o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigénio singlete (1O_2) e os radicais livres superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxilo (HO^{\bullet}) e peróxilo (ROO^{\bullet}); exemplos de RNS são os radicais livres monóxido de azoto (NO^{\bullet}) e o dióxido de azoto (NO_2^{\bullet}) (Ternay e Sorokin, 1997).

Ambas as circunstâncias, excesso de ROS e défice de antioxidantes, podem ser impulsionadas por fatores como uma alimentação nutricionalmente pobre, a poluição do ar, contacto com químicos, alcoolismo, radiação, entre outros (Lobo *et al.*, 2010). Os ROS reagem com uma grande variedade de constituintes celulares, nomeadamente com (i) as proteínas através de reações de oxidação; (ii) o ácido desoxirribonucleico (ADN), provocando mutações que activam oncogenes e/ou que inactivam supressores de tumores; e (iii) os lípidos através da peroxidação lipídica (Forkink *et al.*, 2010; El-barbary *et al.*, 2011; Kuno *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica pode ter origem enzimática, quando radicais lipídicos (R^{\bullet}) são formados pela ação de determinadas enzimas, as lipoxigenases, sobre ácidos gordos insaturados livres; ou pode ter início quando ocorre a reação de Fenton, isto é, quando uma molécula H_2O_2 oxida um ião Fe^{2+} dando origem a radicais OH^{\bullet} , a iões Fe^{3+} e a uma molécula hidróxido (OH). A etapa de iniciação da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais OH^{\bullet} formados reagem preferencialmente com os ácidos gordos polinsaturados (RH), originando moléculas de água e radicais R^{\bullet} . Estes radicais R^{\bullet} reagirão com moléculas de oxigénio (O_2), formando radicais peróxilo lipídicos (ROO^{\bullet}). Por sua vez, os radicais ROO^{\bullet} vão reagir com outros ácidos gordos polinsaturados, produzindo mais radicais R^{\bullet} , e moléculas de hidroperóxido lipídico (ROOH). O processo propagar-se-á enquanto radicais R^{\bullet} reagirem com O_2 , e apenas terminará quando dois radicais começarem a reagir entre si. As moléculas ROOH são o primeiro produto da peroxidação lipídica que, ao reagirem com iões metálicos, originarão diferentes dialdeídos (produtos secundários), incluindo o malondialdeído (MDA), que são mutagénicos e carcinogénicos (Repetto, 2012). A peroxidação lipídica encontra-se,

por isso, associada ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como doenças cardiovasculares e cancro (Niki, 2012; Pinchuk *et al.*, 2012). Por outro lado, a nível alimentar, a peroxidação lipídica também está associada à redução do período de vida útil de produtos alimentares (Pinchuk *et al.*, 2012).

1.4. A importância dos compostos antioxidantes

A condição de *stress* oxidativo pode ser prevenida ou retardada por compostos com ação antioxidante, nomeadamente através da sua capacidade antiradical. Comumente, os antioxidantes exógenos são considerados como quaisquer compostos fitoquímicos – provenientes de frutas, vegetais, sementes ou raízes que estão associados à diminuição do risco de contrair diversas doenças crónicas (Liu, 2004) – que, a baixas concentrações, previnem ou retardam a ação de radicais livres sobre lípidos, proteínas e ADN (Becker *et al.*, 2004; Ratnam *et al.*, 2006). Segundo as regulamentações de aditivos alimentares, os antioxidantes são substâncias que prolongam o tempo de vida útil de prateleira de um produto alimentar ao retardar a oxidação lipídica (Pinchuk *et al.*, 2012; Venskutonis, 2014). Como estas definições são generalizadas e os compostos fitoquímicos são de natureza variada, aqueles com atividade antioxidante não podem ser incorporados num grupo ou atribuídos a um mecanismo de ação específicos (Venskutonis, 2014). Uma alimentação equilibrada proporciona doses diárias deste tipo de compostos, que permitem combater o aparecimento de diversas doenças, incluindo o cancro (Donaldson, 2004; Venskutonis, 2014).

1.4.1. Alimentos com potencial antioxidante, anticancerígeno e antibacteriano

Ao longo dos últimos anos, foram vários os estudos científicos que analisaram a capacidade antioxidante de vários legumes e especiarias, incluindo o alho (Du *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2012), a cebola (Nuutila *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011; Siddiq *et al.*, 2013), o tomate (Elbadrawy e Sello, 2011; Abreu e Barcelos, 2012), o açafrão-das-índias (Ak e Gulçin, 2008; Karami *et al.*, 2011; Abbasi *et al.*, 2012), a pimenta preta (Singh e Duggal, 2009; Ahmad *et al.*, 2012) e as sementes de linhaça (Yang *et al.*, 2012; Eilati *et al.*, 2013).

Para além deste potencial antioxidante, comprovou-se igualmente o potencial anticancerígeno de alguns dos seus compostos, como por exemplo, o dissulfureto de dialilo, presente no alho e na cebola (Robert *et al.*, 2001; Kris-Etherson *et al.*, 2002); a quercetina,

que se encontra no alho, na cebola, no açafrão-das-Índias e no tomate (Kris-Etherson *et al.*, 2002; Bhagwat *et al.*, 2013); o licopeno, presente no tomate (Kris-Etherson *et al.*, 2002; Palozza *et al.*, 2011); o canferol, que pode ser encontrado na cebola e no tomate (Calderón-Montaña *et al.*, 2011; Chen e Chen, 2013); a curcumina, existente no açafrão-das-Índias (Kaefer, 2008; Lin e Lin, 2008; Ravindran *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012); as lignanas, presentes nas sementes de linhaça (Cordeiro *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010; Shim *et al.*, 2014); a apigenina, existente na cebola (Davis *et al.*, 2010); e o ácido α -linoleico (ácido gordo polinsaturado - ω -3) (Hardman, 2002) que está presente nas sementes e no óleo de linhaça (Harper *et al.*, 2006). O potencial anticancerígeno destes compostos reside na sua capacidade para atuar sobre as diferentes fases do cancro, nomeadamente na iniciação, na proliferação e na metástase, quando o cancro consegue propagar-se pelo resto do organismo. Também podem atuar sobre o processo de angiogénese, isto é atuam sobre a formação de vasos sanguíneos que aumenta a disponibilidade de nutrientes e oxigénio nas células cancerígenas (Davis *et al.*, 2010).

Adicionalmente, sabe-se que as especiarias (Trajano *et al.*, 2009) e vegetais (Du *et al.*, 2009) são tradicionalmente adicionados a diferentes tipos de alimentos, incluindo o pescado, não só para apurar as características sensoriais, mas também para inibir o crescimento microbiano responsável pela degradação desses alimentos, bem como o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Tajkarimi *et al.*, 2010). A quercetina, o canferol, a apigenina (Cushnie e Lamb, 2005) e a piperina (Reddy *et al.*, 2004) são exemplos de compostos fitoquímicos com atividade antibacteriana.

1.4.2. Natureza de compostos fitoquímicos

Os compostos fitoquímicos encontram-se divididos em várias subclasses e os compostos referidos no subcapítulo 1.4.1. estão presentes no grupo dos polifenóis, alcaloides, carotenoides, e compostos organossulfurados.

Os polifenóis englobam os flavonoides e os não-flavonoides. Nos flavonoides estão incluídos os flavanonas, como a quercetina e o canferol, e as flavonas, como apigenina (Tiwari *et al.*, 2013). São os mais comuns das respetivas subclasses, havendo muitos outros compostos que são derivados a partir destes (Manach *et al.*, 2004). Curiosamente, o canferol é capaz de aumentar a biodisponibilidade da curcumina, ao impedir que este composto seja expulso por proteínas de resistência nas células do cancro da mama (An *et al.*, 2011). Nos polifenóis não-flavonoides estão incluídas as lignanas (Tiwari *et al.*, 2013) e os ácidos hidroxycinâmicos, onde está incluída a curcumina (Liu, 2004; Harper *et al.*, 2006). Entre os 3

a 5% de curcuminóides presentes no açafrão-das-Índias, 50% a 70% correspondem à curcumina (Esatbeyoglu *et al.*, 2012).

Na subclasse dos alcaloides está incluída a piperina (Wattanathorn *et al.*, 2008) que, para além do seu potencial antioxidante e anticancerígeno (Meghwal e Goswami, 2013), também melhora a biodisponibilidade de vários compostos fitoquímicos, como do β -caroteno e da curcumina (Singh e Duggal, 2009). O estudo de Upadhyay *et al.* (2013) revelou que 95,61% da pimenta preta é composta por piperina.

Os carotenoides têm vindo a atrair atenção devido às suas propriedades antioxidantes (Liu, 2004; Mueller e Boehm, 2011), como o β -caroteno (ricamente presente em frutas e vegetais amarelados, como a linhaça) e o licopeno (ricamente presente em frutas e vegetais vermelhos, como o tomate) (Liu, 2004).

No caso dos compostos organossulfurados, que possuem, pelo menos, uma ligação covalente entre um átomo de carbono e um átomo de enxofre, encontra-se o dissulfureto de dialilo, responsável pelo odor característico do alho (Tiwari *et al.*, 2013).

Uma nutrição natural e equilibrada proporciona doses diárias suficientes destes compostos fitoquímicos, contudo estes também podem ser adquiridos através de alimentos especialmente enriquecidos com frutas, vegetais e especiarias (Venskutonis, 2014).

1.5. Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais fornecem benefícios para além da nutrição básica devido à presença de compostos bioativos que estão associados à prevenção de doenças, como o cancro, as doenças cardiovasculares, os diabetes e a obesidade (Kraushik, 2010).

Estão incluídos na categoria de alimentos funcionais os alimentos fortalecidos, como os sumos de frutas com cálcio, ácido fólico ou vitamina D adicionados que reduzem o risco de osteoporose, osteomalacia, hipertensão e malformações no tubo neural do feto; e os alimentos melhorados, como os próbióticos, que incluem suplementos microbianos com efeitos benéficos para o consumidor, nomeadamente no tratamento de alergias respiratórias, diarreia e eczema (Pang *et al.*, 2012).

Para adicionar benefícios extra a um produto alimentar, tem-se vindo a recorrer ao uso de proteínas vegetais, fibras, plantas medicinais, especiarias, microrganismos (Zhang *et al.*, 2010), e ao uso de produtos do mar, tais como algas, microalgas, cartilagem de peixes, óleo de peixe, entre outros (Kadam e Prabhasankar, 2010). Béliveau e Gingras (2006) sugerem

usar a cebola, o alho, o açafrão e a pimenta-preta como ingredientes funcionais devido às suas propriedades antioxidantes e anti-carcinogénicas em diferentes fases da doença.

Como um alimento enriquecido com antioxidantes apresenta um impacto positivo na saúde em geral (Kraushik, 2010) e o aproveitamento do pescado desperdiçado é uma necessidade urgente (OCEANA, 2011), existe uma oportunidade para desenvolver produtos alimentares que, não só poderão diminuir o volume de desperdício, como serão uma fonte importante a nível nutricional (Elvevoll, 2004; Reis *et al.*, 2012).

1.6. Avaliação da capacidade antioxidante e dos efeitos citotóxico e antiproliferativo

Os antioxidantes beneficiam a saúde ao (i) prevenir a formação de radicais livres, (ii) neutralizar os radicais livres gerados pelo metabolismo ou por fontes exógenas (ou seja, atuam durante o *stress* oxidativo), (iii) reparar danos causados pelos radicais livres (como a reparação de ADN danificado), e (iv) aumentar a expressão dos antioxidantes enzimáticos (Bianchi e Antunes, 1999). Quanto a neutralizar radicais livres, os antioxidantes atuam através da doação de um átomo de hidrogénio, produzindo um radical livre menos reativo (Wright *et al.*, 2001). É através desta capacidade antiradical que o potencial antioxidante de um alimento pode ser avaliado (Tirzitis e Bartosz, 2010).

Contudo, os compostos fitoquímicos não demonstram apenas atividade antioxidante, estando bem documentadas as suas capacidades para intervir em diferentes fases do cancro (Bennet *et al.*, 2012). Por norma, recorre-se a dois ensaios para determinar o potencial anticancerígeno *in vitro* de um produto alimentar, nomeadamente os testes de citotoxicidade, que permitem detetar a ação tóxica de compostos num conjunto de tecidos específico (Ekwall *et al.*, 1990), e os testes de proliferação celular que, por desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de um cancro, permite avaliar a capacidade antiproliferativa do produto alimentar (Mori *et al.*, 1999).

1.7. Avaliação da deterioração e segurança de alimentos

O período de vida útil de prateleira de pescado e derivados de pescado depende das alterações sensoriais, químicas e bioquímicas que o pescado sofre. Por sua vez, estas alterações ocorrem devido a fatores como a espécie, o tamanho, o estado fisiológico, a alimentação e as condições (temperatura e poluição das águas), a população microbiana

presente, métodos de captura utilizados, e o tratamento de conservação aplicado ao pescado (Huss, 1995).

O controlo através de análises microbiológicas é prática recorrente para avaliar o estado de deterioração do alimento provocada pela ação microbiana e a possível presença de microrganismos patogénicos. A contagem de microrganismos aeróbios e anaeróbios viáveis é um parâmetro microbiológico que permite avaliar o período de vida útil de um produto alimentar embalado a vácuo. A contagem de microrganismos indicadores de contaminação fecal (como a *E. coli*) permite avaliar o estado higiénico do alimento, e a pesquisa de microrganismos patogénicos avalia a segurança alimentar (Huss, 1995). Entre os microrganismos patogénicos associados ao pescado encontram-se *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, entre outros. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *E. coli* encontram-se entre os possíveis patogénicos não indígenas presentes no pescado (Huss, 1993).

As metodologias bioquímicas permitem relacionar padrões quantitativos com níveis de deterioração alimentar aceitáveis de um produto alimentar, evitando desse modo que a avaliação seja feita por parâmetros qualitativos ou opinião pessoal (Huss, 1995). Uma das metodologias usadas é a determinação do grau de rancidez, resultante da peroxidação lipídica do alimento.

A alteração da cor do alimento, por sua vez, pode ser avaliada por uma análise sensorial ou ser medida por um colorímetro, o que se traduz numa leitura automatizada, mais precisa, objetiva e não destrutiva da amostra (Wu e Sun, 2013).

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivos gerais

O hambúrguer de pata-roxa é um produto alimentar desenvolvido com o intuito de adicionar valor a pescado desperdiçado e atualmente subvalorizado. O hamburger é composto por certos ingredientes (cebola, alho, polpa de tomate, açafrão-das-Índias, pimenta preta e óleo e sementes de linhaça) que foram adicionados ao pescado a fim de conferir funcionalidade antioxidante ao produto alimentar. Os objetivos do presente trabalho consistem em avaliar o potencial antioxidante e observar a estabilidade do produto em armazenamento após embalamento a vácuo.

1.8.2. Objetivos específicos

Relativamente ao novo produto alimentar, pretende-se:

1. Avaliar o seu potencial antioxidante através do estudo da capacidade de redução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e de radicais de oxigénio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC), e da quantificação total de polifenóis (QTP) pelo método de Folin-Ciocalteu (FC);
2. Avaliar o seu potencial antiproliferativo e citotóxico na linha celular do cancro da mama MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) pelos métodos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e de Acetoxi-metil éster de calceína (calceína-AM);
3. Avaliar o efeito do tratamento térmico do produto alimentar sobre o potencial antioxidante, citotóxico e antiproliferativo;
4. Observar a estabilidade em armazenamento do hambúrguer de pata-roxa embalado a vácuo através de:
 - a. Estudo microbiológico, usando metodologias de referência, nomeadamente contagens de anaeróbios e aeróbios viáveis “totais” e produtores de sulfureto de hidrogénio (H₂S), enterobactérias e *E.coli*, e pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores e *Salmonella* spp;
 - b. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) pelo método da medição de substâncias reativas com TBA;
 - c. Avaliação da cor do produto alimentar pelo sistema colorimétrico da Comissão Internacional da Iluminação (*Commission Internationale de l'Eclairage* - CIE-L*a*b).

Materiais e Métodos

2.1. Confeção do hambúrguer de pata-roxa

A receita do hambúrguer de pata-roxa incluiu os seguintes ingredientes: cebola (*Allium cepa*), alho (*Allium sativum*), açafrão-das-índias (*Curcuma longa*), pimenta preta (*Piper nigrum*), polpa de tomate (*Lycopersicon esculentum*), óleo e sementes de linhaça (*Linum usitatissimum*), bem como pescado subvalorizado (*Scyliorhinus canicula*). Estes foram adquiridos no supermercado Intermaché local, com exceção do óleo de linhaça, que foi encomendado à empresa *Provida – Produtos Naturais*. A pata-roxa e a cebola apenas foram adquiridos no dia de preparação de hambúrgueres de pata-roxa. Os ingredientes encontravam-se em embalagens seladas e o pescado foi comprado sem pele e vísceras, e cortado às postas. O transporte dos ingredientes foi rápido (5 minutos de carro do estabelecimento comercial ao laboratório) e por isso mantidos à temperatura ambiente. Após chegada ao laboratório, os ingredientes foram armazenados num local seco e fresco, e as respetivas embalagens foram mantidas seladas até à preparação dos hambúrgueres de pata-roxa. O pescado foi mantido em refrigeração (inferior a 5°C) até ser usado na preparação dos hambúrgueres.

Para a preparação das amostras-controlo, foram usados somente 50,10g de pata-roxa. Os hambúrgueres foram confeccionados com 50,10g de pata-roxa, 20,17g de cebola, 3,00g de alho em pó, 3,04g de açafrão, 0,8g de pimenta preta, 15,77g de polpa de tomate, 3,58g de sementes de linhaça, 4,96g de óleo de linhaça e 0,08g de sal para hambúrgueres de peso final de 100g. Esta receita foi adaptada do trabalho realizado por Marinho e Norte (2012). Por sua vez, este trabalho (projeto de final de licenciatura) baseou a receita nos estudos de Béliveau e Gingras (2006), tendo introduzido modificações a fim de melhorar algumas características sensoriais. As amostras preparadas foram embaladas a vácuo (BOXER 42, Henkelman, Holanda) e posteriormente armazenadas numa arca a -80°C (Isotemp®, Fisher Scientific, Reino Unido) até serem analisadas.

Ao todo foram preparados três lotes de amostras:

- Lote 1 (preparado a 30 de Outubro de 2013), permitiu o estudo do potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa;
- Lote 2 (preparado a 31 de Janeiro de 2013), permitiu o estudo do efeito da duração do processo de extração e do tratamento térmico sobre o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa;
- Lote 3 (preparado a 2 de Junho de 2014), permitiu o estudo da estabilidade do hambúrguer de pata-roxa conservado em vácuo e em refrigeração.

Dependendo da quantidade de amostras necessária para a realização dos ensaios a realizar, a confeção dos hambúrgueres durou entre 4h a 6h desde a preparação dos ingredientes ao armazenamento dos hambúrgueres de pata-roxa.

2.1.2. Tratamento Térmico

Algumas amostras do lote 2 foram submetidas a um tratamento térmico de 180°C durante vinte minutos num forno previamente aquecido (MM100EEP1, Foinox, Itália). Estas condições foram aplicadas tendo em conta as recomendações europeias (ECFF, 2006) para reduzir a presença de microrganismos patogénicos num produto alimentar tratado termicamente.

2.2. Processo de extração

As amostras submetidas ao processo de extração foram previamente liofilizadas (CollSafeTM Scanvac, Labogene, Dinamarca) num ciclo de dois dias a -60°C. No processo de extração, foram usados como solventes o metanol (>98,5%, ProLabo, VWR, França), o metanol aquoso a 80% e a mistura metanol com diclorometano (4:1) (99,9 %, ProLabo, VWR, França). Testaram-se também diferentes tempos de extração, nomeadamente 12 e 24 horas.

O processo de extração foi realizado com agitação constante, protegido da luz e à temperatura ambiente (20 a 25°C). De seguida, procedeu-se à filtração dos extratos (porosidade 6-10µm) (Qualitative Filter Paper, Fioroni, França) e os solventes foram evaporados num rotavapor (Laborotta 4000-efficient, Heidolph Instruments, Espanha) à temperatura de 40°C. Os extratos secos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9%, Sigma-Aldrich, Alemanha) a uma concentração final de 100mg/mL e armazenados a -20°C até à realização dos ensaios.

2.3. Avaliação da capacidade antioxidante

2.3.2. Redução do radical livre DPPH

A redução do radical livre DPPH foi executada a partir do protocolo adaptado de Duan *et al.* (2006). Numa placa de 96 poços, foram colocados 198µL de solução stock 0,1M DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) previamente preparada em etanol (96%, AGA, Portugal) e 2µL

de DMSO para o controlo (n=8), ou 2µL de extrato para os ensaios (n=5). Os brancos dos ensaios foram preparados com 198µL de etanol e 2µL de extrato (n=3). Incubou-se a placa no escuro durante 30 minutos e mediu-se a absorvância a 517nm no leitor de placas (Synergy H1 Hybrid Reader, Estados Unidos). A percentagem da redução média final foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = \left(1 - \frac{\lambda_E - \lambda_B}{\lambda_C} \right) \times 100, \quad (1)$$

sendo λ_E a absorvância do extrato, λ_B a absorvância do branco do extrato, e λ_C a absorvância do controlo. A redução média final foi expressa em percentagem de redução final. O valor da concentração de amostra necessária para reduzir a atividade do radical livre em 50% (EC₅₀), expresso em microgramas por mililitro, foi calculado para os extratos com uma atividade de redução de DPPH superior a 50%. Foi determinada a curva sigmoideal com concentrações de 1; 0,3; 0,1; 0,03 e 0,01 mg extrato/mL (n=4), recorrendo ao *software* GraphPad Prism®5.01, como aconselhado por Chen e Frolidi (2013).

2.3.3. Quantificação total de polifenóis

A QTP foi avaliada pelo método FC adaptado a partir do trabalho realizado por Yu *et al.* (2002). Numa placa de 96 poços, foram adicionados 158µL de água destilada e 2µL de extrato para realizar os ensaios (n=4), e 168µL de água destilada e 2µL de extrato para realizar os respetivos brancos (n=3). Aos poços dos ensaios foram adicionados 10µL de reagente FC (Panreac, Espanha). Incubou-se a placa durante 2 minutos no escuro. Foram adicionados 30 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20% (>99,5%, Merck, Alemanha) a todos os poços e incubou-se a placa no escuro durante 1 hora. O ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi escolhido como padrão e foram preparadas as concentrações de 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 e 0mg/mL de ácido gálico em água destilada para determinar a curva de calibração. A absorvância foi medida a 755nm num leitor de placas. A QTP foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100g de amostra através da seguinte fórmula:

$$QTP(mgEAG/100g_{\text{Amostra}}) = \frac{QTP(mgEAG/g_{\text{Extrato}}) \times m_{ET} \times 100g}{m_i}, \quad (2)$$

sendo m_{ET} a massa de extrato seco total em gramas obtida do processo de extração e m_i a massa inicial de amostra em gramas usada para realizar o processo de extração.

2.3.4. Avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigénio

A capacidade de redução de radicais de oxigénio, pelo método de ORAC, foi avaliada a partir do protocolo adaptado de Dávalos *et al.* (2004). Numa placa de 96 poços, adicionaram-se 20 µL de extrato a 120 µL de solução de fluoresceína 0,117 µM para preparar os ensaios (n=4), numa placa de 96 poços. Para os respetivos brancos, 20 µL de extrato diluído foram adicionados a 120 µL de tampão fosfato 75mM pH 7,4. Incubou-se a placa no escuro a 37°C durante 15 minutos e a seguir adicionou-se 60 µL de solução de 2, 2-azobis (2-aminopropano) dihidroclorato (AAPH) (97%, Aldrich, Sigma-Aldrich, Alemanha) a 20% previamente aquecida a 37°C. A leitura foi realizada minuto a minuto durante 4 horas nos comprimentos de onda de excitação a 490nm e de emissão a 530nm no leitor de placas. O composto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox) (97%, Aldrich, Alemanha) foi usado como padrão para a curva de calibração com concentrações de 80, 40, 20, 10 5 e 0µM de Trolox. Os resultados para ORAC foram expressos em micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por 100g de amostra através da seguinte fórmula:

$$ORAC(\mu\text{molET} / 100g_{\text{Amostra}}) = \frac{ORAC(\mu\text{molET} / g_{\text{Extrato}}) \times m_{ET} \times 100g}{m_i}, \quad (3)$$

sendo m_{ET} a massa de extrato seco total em gramas obtida do processo de extração e m_i a massa inicial de amostra em gramas usada para realizar o processo de extração.

2.4. Avaliação citotóxica e antiproliferativa

2.4.1. Manutenção e preparação da cultura MCF-7

As células da linha do cancro da mama (*Michigan Cancer Foundation-7- MCF-7*) foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma, Alemanha) enriquecido com 10% de soro bovino fetal (*Fetal Bovine Serum - FBS*) (Sigma, Alemanha), 1% de meio de cultura para tecidos celulares com aminoácidos não essenciais (*Modified Eagle Medium - MEM*) (Sigma, Alemanha) e 10µg/mL de insulina humana (Sigma, Alemanha). As células foram cultivadas a 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de humidade numa incubadora de CO₂ (Water Jacket-3500 Series, CO₂ Unitherm Incubator). O meio RPMI 1640 enriquecido foi renovado a cada dois dias.

Para manter a linha celular, as células que se apresentavam em monocamada (após 4 a 5 dias em cultura) foram levantadas com 500µL de tripsina (Sigma, Alemanha) e incubadas à temperatura ambiente durante minuto e meio. Por aspiração, removeu-se a tripsina e incubou-

se nas condições de crescimento durante oito minutos. Findo esse tempo, adicionaram-se 4mL de meio RPMI 1640 enriquecido para levantar as células. Dessa suspensão celular transferiu-se 1mL por cada nova placa de crescimento, adicionando de seguida 5mL de meio RPMI 1640 enriquecido, mudando sempre o meio 12h após as células terem sido semeadas. Acompanhou-se o crescimento da linha celular pela observação ao microscópio (Leica Microsystems, Alemanha). Para preparar placas de 96 poços com a cultura celular, procedeu-se à sementeira das placas com 20 μ L de suspensão celular e 198 μ L de meio RPMI 1640 enriquecido. Cada poço foi semeado com uma média de $8,0 \times 10^4$ células/mL contabilizadas através de uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Alemanha).

2.4.2. Ensaios de viabilidade celular e proliferação celular

O efeito dos extratos de pata-roxa e do hambúrguer de pata-roxa foi avaliado na viabilidade celular e na proliferação celular das células MCF-7. No ensaio de proliferação celular as células foram incubadas com extratos após 12 horas de serem semeadas. Por sua vez, o ensaio de viabilidade celular foi realizado após as células atingirem a confluência total (após 4 a 5 dias em cultura).

Os extratos das amostras foram preparados para uma concentração final de 1mg/mL em meio RPMI 1640 enriquecido, esterilizados sob a luz ultravioleta durante 15 minutos e adicionados na placa de ensaio para um volume final de 200 μ L. As células foram incubadas com extratos durante 24 horas. O efeito dos diferentes extratos sobre as células MCF-7 foi revelado pelo método de MTT e pelo método de calceína-AM.

2.4.2.1. Método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)

Este método experimental foi adaptado do trabalho realizado por Yuan e Walsh (2006). Após a incubação das células MCF-7 com os extratos durante 24 horas, as células foram lavadas com 200 μ L de tampão Hank (composição de meio: 137mM NaCl, 5mM KCl, 0,8mM MgSO₄, 0,33mM Na₂HPO₄, 0,44mM KH₂PO₄, 0,25mM CaCl₂, 1,0mM MgCl₂, 0,15mM Tris HCl e 1,0mM C₄H₇NaO₂, pH=7,4). De seguida, adicionaram-se 100 μ L de MTT (1,2mM) (Sigma, Alemanha) previamente dissolvido em tampão Hank e incubou-se a placa durante 2 horas. Após esse período de tempo, foram adicionados 100 μ L de 0,04N HCl em isopropanol ($\geq 99,5\%$, Panreac, Espanha) e homogeneizou-se de forma a levantar as células (processo realizado em gelo). A placa foi incubada à temperatura ambiente e protegida da luz durante 2

horas. Os resultados foram obtidos por espectrofotometria a um comprimento de onda de 570nm.

2.4.2.2. Método da calceína-AM

Este método experimental foi adaptado do trabalho realizado por Pedrosa e Soares-da-Silva (2002). Após a incubação das células MCF-7 com os extratos durante 24 horas, cada poço foi lavado duas vezes com 200µL de tampão Hank. Adicionaram-se 100µL de tampão Hank e procedeu-se a leitura de autofluorescência das células para cada situação no leitor de placas. De seguida, foram adicionados 200µL de uma solução de 2µM calceína-AM (Invitrogen, Estados Unidos da América) previamente preparada em tampão Hank a todos os poços depois de desprezar o tampão para os brancos. A placa foi deixada a incubar à temperatura ambiente e protegida da luz durante 15 minutos. Findo esse tempo, procedeu-se a uma nova leitura de fluorescência. Ambas as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 485nm (emissão) e de 530nm (excitação).

Os resultados do efeito dos extratos de pata-roxa e de hambúrguer de pata-roxa sobre a viabilidade celular e a proliferação celular das células MCF-7 foram expressos em percentagem do controlo, tendo sido calculados pela seguinte fórmula:

$$\%_{\text{Controlo}} = \left(\frac{F_{\text{amostra}}}{F_{\text{controlo}}} \right) \times 100, \quad (4)$$

sendo F_{controlo} a fluorescência do controlo (células cultivadas em meio de cultura contendo DMSO), e F_{amostra} a fluorescência do extrato (células cultivadas em meio de cultura contendo os extratos). Para os extratos que reduziram ou inibiram, a viabilidade celular e a proliferação celular, respetivamente, em mais 50%, foram realizados ensaios de dose-resposta (10, 30 e 100µg/mL).

2.5. Avaliação da estabilidade após embalamento a vácuo

2.5.1. Estudo microbiológico

2.5.1.1. Preparação do lote

Um novo lote de hambúrgueres de pata-roxa foi preparado especificamente para avaliar a estabilidade do novo produto alimentar (lote 3). Os hambúrgueres de pata-roxa e os

controles (compostos somente por pata-roxa) possuíam um peso médio de 51g, não foram tratados termicamente e foram posteriormente embalados a vácuo.

2.5.1.2. Condições de estudo

O lote foi armazenado em refrigeração e a temperatura de armazenamento foi registrada por um *datalogger* (HI 141CH, Hanna, Itália). Duas amostras de controle e duas amostras de hambúrguer de pata-roxa foram selecionadas aleatoriamente para efetuar as análises microbiológicas. As amostras frescas e os restantes tempos de análise foram analisados dezassete horas e a cada dois dias após a preparação do lote, respetivamente. O estudo da estabilidade durou catorze dias.

2.5.1.3. Parâmetros Microbiológicos

A conduta no laboratório para a realização das análises microbiológicas seguiu a ISO7218 (2007), exceto quando indicado o contrário.

2.5.1.4. Preparação do material e meios de cultura

O material de vidro e os meios de cultura foram preparados segundo as normas do laboratório. A maioria dos meios de cultura utilizados neste estudo foi adquirida na sua forma desidratada e preparados segundo as instruções do fabricante. As condições de esterilização foram 121°C durante 15 minutos, exceto quando indicado em contrário. Os restantes meios de cultura, nomeadamente o *Salmonella Express* (SE) (BioMérieux, França), foram adquiridos já preparados pelo fabricante e usados de acordo com as suas especificações.

2.5.1.5. Diluentes

O diluente à base de água peptonada (*Maximum Recovery Diluent* - MRD) (Scharlau, Espanha) foi preparado em água destilada e aquecido até completa dissolução. Foi usado para preparar a suspensão-mãe e as diluições sucessivas das amostras. Preparou-se igualmente água peptonada tamponada (*Buffered Peptone Water* - BPW) (Merck, Alemanha) para a suspensão de enriquecimento primário para a pesquisa de *Salmonella* spp.

2.5.1.6. Suspensões-mãe e diluições sucessivas

As suspensões-mãe e diluições decimais das amostras foram preparadas em condições assépticas tendo em conta a ISO6887-1 (1999) e a ISO6887-3 (2003). A toma de 25g de amostra compreendia 12,5g de duas amostras independentes, para obter uma maior representatividade dos resultados, dado que o número elevado de parâmetros considerados para o estudo microbiológico e o número de amostras a analisar limitaram amostragens de maior dimensão. As suspensões-mãe foram preparadas com 225mL de diluente e 25g de amostra e colocadas no homogeneizador (Masticator Classic Panoramic, IUL Instruments, Espanha) durante 60 segundos. Ao todo, prepararam-se duas suspensões-mãe para cada tipo de amostra: uma suspensão-mãe para a pesquisa de *Salmonella* spp. preparada com diluente BPW e a segunda suspensão-mãe para os restantes parâmetros microbiológicos preparada com diluente MRD, da qual se prepararam as diluições decimais (2mL da diluição anterior adicionado a 18mL de diluente MRD) até à diluição 10^{-9} para um volume final de 20mL.

2.5.1.7. Contagens de microrganismos aeróbios e anaeróbios “totais” e degradativos produtores de H₂S

Na caracterização microbiológica das amostras, efetuaram-se contagens do número de unidades formadoras de colónias (ufc) de microrganismos “totais” e degradativos produtores de H₂S conforme a norma NMKL 86 (2003). Ambos os parâmetros foram estudados em simultâneo, no meio sólido *Iron Agar Lyngby* (Oxoid, Reino Unido). Este meio foi suplementado com uma solução de cloridrato de L-cisteína a 4% (Scharlau, Espanha) esterilizada através de filtros com membrana de polietersulfona de 0,22µm de porosidade (Filtres Fioroni, França). Após a preparação das diluições sucessivas, o inóculo foi incorporado no meio em placas de Petri de 90mm de diâmetro (DeltaLab, Espanha), adicionou-se uma camada extra de meio e deixou-se a uma temperatura média de 22,2°C [21,5; 24,1°C] durante 3 dias. A temperatura de incubação foi registada por um *datalogger*. Algumas placas com inóculo foram incubadas aerobicamente e outras anaerobicamente, tendo sido colocadas na forma invertida em jarras de anaerobiose (Oxoid, Reino Unido). O ambiente de anaerobiose foi alcançado pelo uso de saquetas Anaerocult A® (MERCK, Alemanha) e garantido pelo uso de tiras Anaerotest® (MERCK, Alemanha). As saquetas Anaerocult promovem a remoção de O₂ e a produção de CO₂. Foram consideradas placas contáveis as que tinham entre 25 a 250 colónias para a determinação do número de microrganismos. Os resultados obtidos foram expressos em ufc por grama de amostra (ufc/g).

2.5.1.8. Pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

A pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores foi efetuada conforme a NP 2262 (1986) no meio sólido *Sulfite Polymyxin Sulfadiazine* (SPS) (MERCK, Alemanha). Após a preparação das diluições sucessivas, foram transferidos 10mL da suspensão-mãe e 1mL das diluições 10^{-2} à 10^{-4} para tubos estéreis que, em seguida, foram introduzidos num banho-maria a 80°C durante 10 minutos. Findo esse tempo, 10mL de meio SPS de concentração dupla foram adicionados aos 10mL de suspensão-mãe, enquanto 10 mL de meio SPS de concentração simples foram adicionados ao 1mL de cada diluição. Os meios foram incubados a 37°C durante 5 dias. Os resultados obtidos foram expressos em resultados positivos ou negativos por grama de amostra.

2.5.1.9. Contagem de enterobactérias

As contagens do número de ufc de enterobactérias foram realizadas conforme a ISO7402 (1993) e a ISO21528-2 (2004) no meio sólido *Violet Red Bile Glucose* (VRBG) (Oxoid, Inglaterra). Após a preparação das diluições sucessivas, 1mL de inóculo foi incorporado no meio em duplicado. Uma camada extra de meio foi adicionada para criar uma atmosfera microaerofílica. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. Foram consideradas placas contáveis as que apresentavam entre 15 a 150 colónias (típicas e não típicas) para a determinação do número de microrganismos. Consideraram-se colónias típicas as colónias de coloração rosa a vermelho ou púrpura. Para os testes de confirmação, foi isolada e purificada uma colónia típica por cada placa contável em meio sólido *Nutrient Agar* (NA) (Himedia, Índia) e incubou-se a 37°C durante 24h. Efetuou-se o teste de oxidase (Oxoid, Inglaterra) e inoculou-se a cultura em 10mL de *Bromcresol Purple Dextrose Broth* (BCP Dextrose) (Himedia, Índia). A confirmação de enterobactérias ocorre quando o resultado do teste de oxidase é negativo e surge mudança de cor no caldo BCP Dextrose, indicando que o microrganismo fermenta a glucose. Os resultados obtidos foram expressos em ufc/g.

2.5.1.10. Contagem de *Escherichia coli*

As contagens do número de ufc de *E.coli* foram elaboradas conforme a ISO16649-2 (2001) no meio sólido *Tryptone Bile X-glucuronide* (TBX) (MERCK, Alemanha) Após a preparação das diluições sucessivas, 1mL de inóculo foi incorporado no meio em duplicado e incubado a 44°C durante 24 horas. Foram consideradas placas contáveis as que apresentavam entre 15 a 300 colónias (típicas e não típicas) para a determinação do número de

microrganismos. Consideraram-se colónias típicas as colónias azuis ou azul-esverdeadas. Os resultados obtidos foram expressos em ufc/g.

2.5.1.11. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada conforme o procedimento descrito no certificado de validação BIO-12/16-09/05 (2005) e detetada pelo sistema VIDAS[®]. Primeiro foi preparada uma solução de enriquecimento com 225mL de BPW e 25g de amostra. A incubação ocorreu durante 24 horas a 37°C. Em seguida, 500µL de inóculo foram transferidos para o caldo SE e incubou-se a 41,5°C durante 24 horas. Findo esse tempo, procedeu-se à análise da amostra. Transferiu-se 1 a 2mL de caldo SE inoculado para tubos com rosca e deixou-se ferver em banho-maria a 100°C durante 15 minutos. Foram transferidos 500µL do caldo fervido e arrefecido para uma barrete VIDAS[®] *Salmonella* (BioMérieux, França) e procedeu-se à leitura no sistema miniVIDAS[®] (BioMérieux, França) previamente calibrado segundo as instruções do fabricante. Os resultados obtidos foram expressos como ausência de *Salmonella* (teste < 0,23) ou presença presumível de *Salmonella* (teste ≥ 0,23) em 25g de amostra.

Os testes de confirmação apenas são realizados, aquando de um resultado presumível positivo, ou seja, perante a possibilidade da *Salmonella* estar presente na amostra. Para tal, repica-se do caldo SE (com 72h de incubação, no máximo) para os meios sólidos *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD agar) (Himedia, Índia) e *Salmonella Chromogenic Agar* (Salmonella Detection and Identification – SMID 2) (BioMérieux, França) e incuba-se a 37°C durante 24h. No caso de não ocorrer desenvolvimento à superfície destes meios, prolonga-se a incubação por mais 24h e transfere-se 0,5mL de caldo SE inoculado para 10mL de caldo *Rappaport Vassiliadis Soja* (RVS) (Biokar, França). Deixa-se a incubar a 41,5°C durante 24h e repete-se a repicagem em XLD agar e SMID 2. Em seguida, procede-se à recuperação e purificação das colónias típicas em meio sólido NA e, posteriormente, à inoculação de tubos (rampa e fundo) com meio *Kligler Iron Agar* (KIA) (Biokar, França). Este meio permite a diferenciação de bacilos Gram-negativos com base na fermentação da glucose e na produção de H₂S. A alteração da cor do meio para amarelo é indicador da utilização da glucose por parte do microrganismo, enquanto a alteração para preto é indicativo da presença de microrganismos produtores de H₂S. A presença de enterobactérias provocará ambas as alterações de cor (Atlas, 2010). Sempre que os tubos com KIA exibem um resultado presumível positivo, é necessário executar, posteriormente, os testes de Gram, oxidase (BIO-

RAD, França) e inocular a cultura em galerias API 20E (BioMérieux, França) para confirmação de *Salmonella*.

2.5.2. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico

O índice de TBA foi determinado conforme a NP 3356 (2002). A amostra foi triturada e pesada em duplicados de 15g. Foram adicionados 30mL de solução de ácido tricloroacético a 7,5% (TCA) (Scharlau, Espanha) e durante 2 minutos a extração foi mantida em agitação. Centrifugou-se a 6000rpm durante 15 minutos e, findo esse tempo, filtrou-se o extrato com papel de filtro de porosidade de 8µm (Whatman, Reino Unido). Transferiram-se até 5mL de cada extrato para tubos de ensaios e adicionaram-se 5mL de solução de TBA 0,02mol/L (Merck, Alemanha). Os tubos foram colocados em banho-maria a 95°C durante 40 minutos. Por último, procedeu-se à leitura da absorvância a 530nm no espectrofotómetro (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, EUA). A curva de padrão foi determinada a partir de uma solução de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 10^{-8} mol/mL para as concentrações de 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05µmol de equivalentes de MDA/mL. O índice de TBA foi expresso em miligramas de MDA por 1000g de amostra e determinado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Índice}_{TBA} = \frac{72 \times c}{m \times v} \times \left(30 + \frac{m \times H}{100} \right), \quad (7)$$

onde *c* é a concentração de MDA expressa em micromoles, *m* é a massa da toma do ensaio expressa em gramas, *v* é o volume de extrato usado no ensaio expresso em mililitros e *H* é a humidade da amostra expressa em percentagem.

A humidade da amostra foi obtida com o auxílio de um analisador de humidade (HB43 Halogen, Mettler Toledo, Estados Unidos). Pesou-se 0,5g de amostra por cada análise e submeteu-se a um aquecimento de 130°C. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem.

2.5.3. Leitura da Cor

A leitura da cor foi adaptada pelo método de Gálan *et al.* (2009), usando um colorímetro (Chromameter CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Japão) sobre a superfície das amostras. As leituras foram realizadas numa sala com luz artificial para evitar variações nas condições de iluminação. Registaram-se 12 leituras por amostra, tendo como referência uma placa de calibração branca ($X=0,3143$, $Y=88,5$ e $y=0,3208$). Foi usado o sistema CIE-L*a*b*, que

analisa a cor através de três parâmetros: L^* , que varia entre o preto (valor mínimo é 0) e o branco (valor máximo é 100); a^* , que varia entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos); e b^* , que varia entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Sant'Anna *et al.*, 2013). A partir destes parâmetros foi possível determinar a diferença total da cor (ΔE), a vivacidade ou saturação da cor (C_{ab}) e a tonalidade da cor (h_{ab}) através das seguintes fórmulas:

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2} \quad (5)$$

sendo a_0^* , b_0^* e L_0^* os valores associados à amostra fresca (dia 0) (Pérez-Alvarez *et al.*, 2006);

$$C_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (6)$$

cujos valores são tão mais altos, quanto maior é vivacidade da cor (Itle e Kabelka, 2009);

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \text{ para } a^*, b^* > 0 \quad (7)$$

$$h_{ab} = 180 + \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \text{ para } a^* < 0 \text{ e } b^* > 0 \text{ ou } a^*, b^* < 0 \quad (8)$$

$$h_{ab} = 360 + \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \text{ para } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (9)$$

em que h_{ab} é expresso em radianos (Sant'Anna *et al.*, 2013); foi necessário o produto $h_{ab}(\text{graus}) = h_{ab}(\text{rad}) \times 57,29578$ (Almeida, 2002) para este parâmetro ser expresso em graus (0° e 360° representam uma tonalidade vermelha, e os ângulos 90° , 180° e 270° representam as tonalidades amarela, verde e azul, respetivamente) (Sant'Anna *et al.*, 2013).

2.6. Análise estatística

Numa primeira fase da análise estatística, os resultados foram avaliados (i) pelo teste paramétrico *t-student* (Zar, 2010) de forma a comparar os resultados da variação do tempo de extração (12h e 24h), dos dois tipos de amostra (pata-roxa e hambúrguer de pata-roxa), dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular em relação ao controlo e das análises microbiológicas; e (ii) pela análise de variância (ANOVA; Zar, 2010) para avaliar o efeito dos três extratos (metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano) e os resultados obtidos da determinação do índice de TBA e da leitura da cor ao longo do tempo. Quando os requisitos para a realização dos testes não foram cumpridos (nomeadamente, a homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados), estes foram analisados pelo teste

Materiais e Métodos

Kruskal-Wallis (Siegel e Castellan, 1988). As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p \leq 0,05$). Sempre que estas foram consideradas estatisticamente significativas, realizou-se o teste de *Dunnnett* (nas situações com o grupo controlo) ou o teste de *Tukey* (nas situações sem grupo controlo). Sempre que adequado os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro-padrão da média (SEM). Todos os cálculos foram realizados com o *software* IBM SPSS Statistics 2.1.

Resultados

3.1. Hambúrguer de pata-roxa sem tratamento térmico

3.1.1. Avaliação da capacidade antioxidante

3.1.1.1. Capacidade de redução do radical DPPH

O DPPH é um radical livre relativamente estável devido à deslocalização do eletrão livre por toda a molécula. Apresenta uma cor púrpura que é caracterizada por uma banda de absorção a 517nm. Facilmente recebe um átomo de hidrogénio de um dador e, quando a forma redutora do DPPH é criada, ocorre uma alteração de cor para amarelo. Como tal, este ensaio permite avaliar a capacidade de moléculas antioxidantes atuarem como redutores de radicais livres (Pisoschi e Negulescu, 2011; Alam *et al.*, 2013). Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do controlo, estando representados nas Figuras 1, 2 e 3.

Através da análise dos resultados (Figura 1), é possível verificar que os extratos dos hambúrgueres de pata-roxa (obtidos após 12 horas de extração) apresentaram maior capacidade de redução do radical DPPH, nomeadamente 79,48%, 75,69% e 73,58%, em contrapartida aos 25,69%, 32,60% e 21,42% para os extratos de pata-roxa, para metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente. Os valores dos três extratos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quer para a pata-roxa (controlo), quer para o hambúrguer ($p \geq 0,05$, ANOVA), contudo houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de amostras ($p \leq 0,05$, *t-student*).

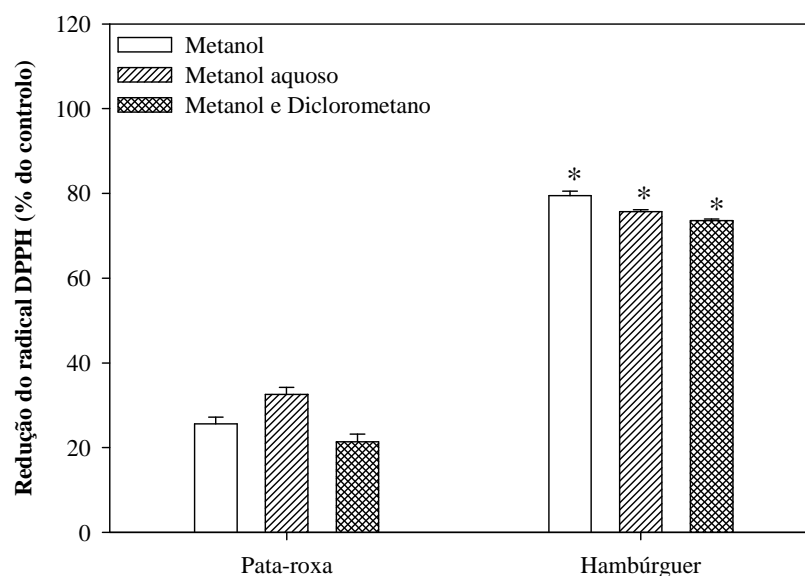


Figura 1 - Capacidade de redução do radical DPPH dos extratos a 1mg/mL obtidos a partir de hambúrguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*).

A capacidade de redução do radical DPPH dos extratos obtidos durante 12 e 24 horas apresentam valores muito próximos (Figura 2) sem diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*). Obtiveram-se 76,65%, 74,56% e 77,19% para os extratos obtidos após 24 horas de extração com metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente. Foi testada a hipótese dos extratos, que apresentaram uma capacidade de redução do radical DPPH superior a 50%, terem um efeito dependente da concentração.

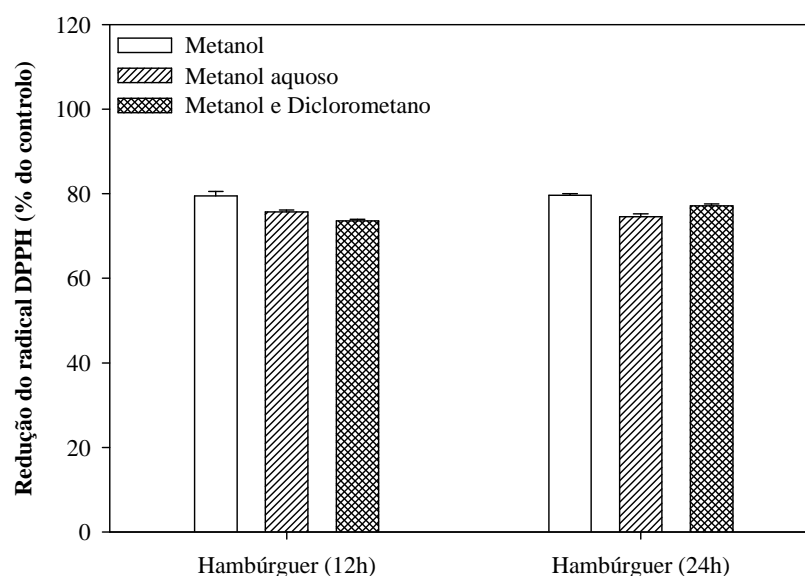


Figura 2 - Capacidade de redução do radical DPPH dos extratos de hambúrguer a 1mg/mL obtidos com diferentes solventes após diferentes tempos de extração (12h e 24h). Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=3).

A partir dos resultados alcançados (Figura 3), verifica-se que os extratos dos hambúrgueres apresentaram um efeito dependente da concentração, sendo possível determinar os valores de EC_{50} (Tabela 1). Verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos diferentes solventes ($p \geq 0,05$, ANOVA), nem entre os valores dos extratos de 12h e 24h de extração ($p \geq 0,05$, *t-student*). Contudo, houve a tendência para o extrato metanólico ter o valor de EC_{50} mais baixo quer a 12h (366,80 $\mu\text{g/mL}$), quer a 24h de extração (354,60 $\mu\text{g/mL}$).

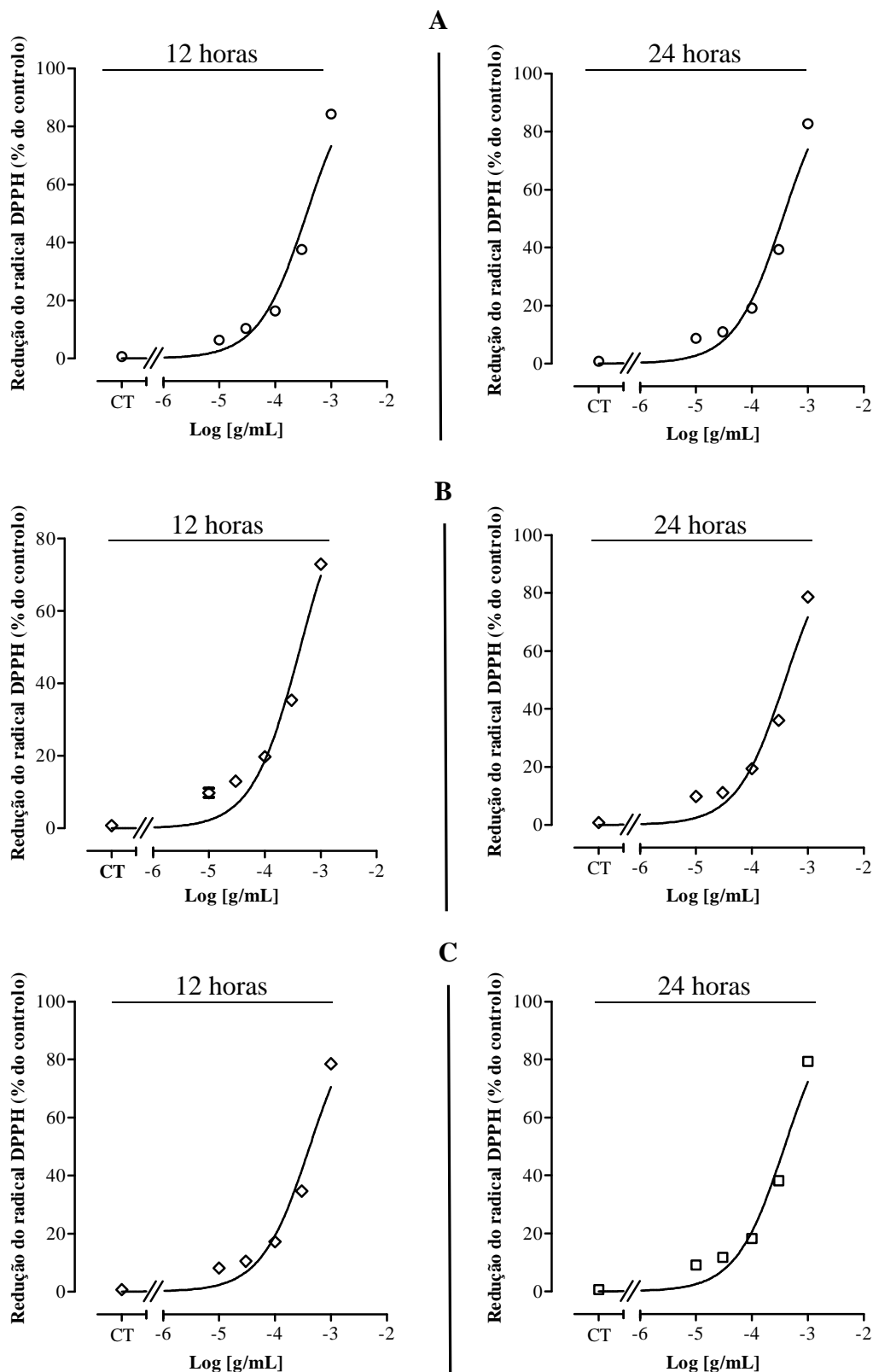


Figura 3 - Dependência da concentração (10-1000 μ g/mL) dos extratos de hambúrguer obtidos com A) metanol, B) metanol aquoso e C) metanol e diclorometano após 12h e 24h de extração, que reduziram a atividade do radical DPPH em mais do que 50% a uma concentração de 1mg/mL. CT: controle. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=12).

Tabela 1 - Valores médios de EC₅₀ [min; máx] (n=12) para os extratos dos hambúrgueres sem tratamento térmico que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH superior a 50%. (1mg/mL).

Tempo de Extração	Solventes	EC ₅₀ (µg/mL)
12 horas	Metanol	366,80 [329,10; 408,80]
	Metanol Aquoso	434,30 [393,00; 480,10]
	Metanol e Diclorometano (4:1)	418,90 [380,60; 461,00]
24 horas	Metanol	354,60 [322,60; 389,80]
	Metanol Aquoso	395,80 [360,20; 435,00]
	Metanol e Diclorometano (4:1)	384,50 [351,20; 420,90]

3.1.1.2. Quantificação total de polifenóis

A QTP foi realizada através do método FC. O método baseia-se na oxidação dos compostos fenólicos numa solução alcalina que desencadeia a transferência de elétrons para o reagente FC. O produto resultante é um complexo azul que pode ser quantificado por espectrometria a 755nm (Bramorski *et al.*, 2010; Blainski *et al.*, 2013). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada 100g de amostra e encontram-se demonstrados nas Figuras 4 e 5.

Verifica-se que os extratos dos hambúrgueres de pata-roxa (obtidos após 12 horas de extração) apresentaram uma maior quantidade de polifenóis, nomeadamente 17,13mg, 20,74mg e 15,80mg EAG/100g em contrapartida aos 9,13mg, 7,00mg e 5,87mg EAG/100g para os extratos de pata-roxa, para extrações com metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente (Figura 4). Os três extratos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quer para a pata-roxa (controlo), quer para o hambúrguer ($p \geq 0,05$, ANOVA), contudo houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de amostras ($p \leq 0,05$, *t-student*).

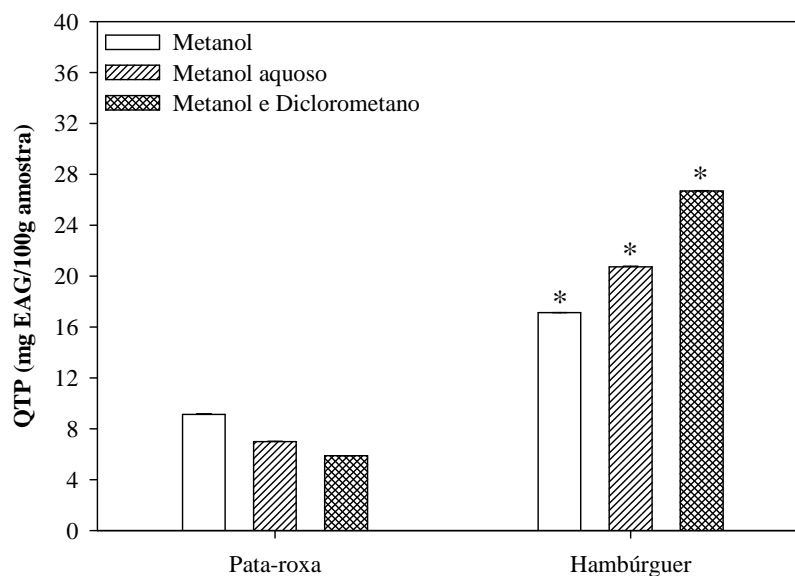


Figura 4 - Quantificação total de polifenóis dos extratos obtidos a partir de hambúguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*).

A quantificação dos polifenóis nos extratos obtidos durante 12 e 24 horas apresentou valores sem quaisquer diferenças estatisticamente significativas (Figura 5, $p \geq 0,05$, *t-student*). Obtiveram-se 16,93mg, 28,49mg e 34,68mg EAG/100g para os extratos obtidos após 24 horas de extração a partir de metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente.

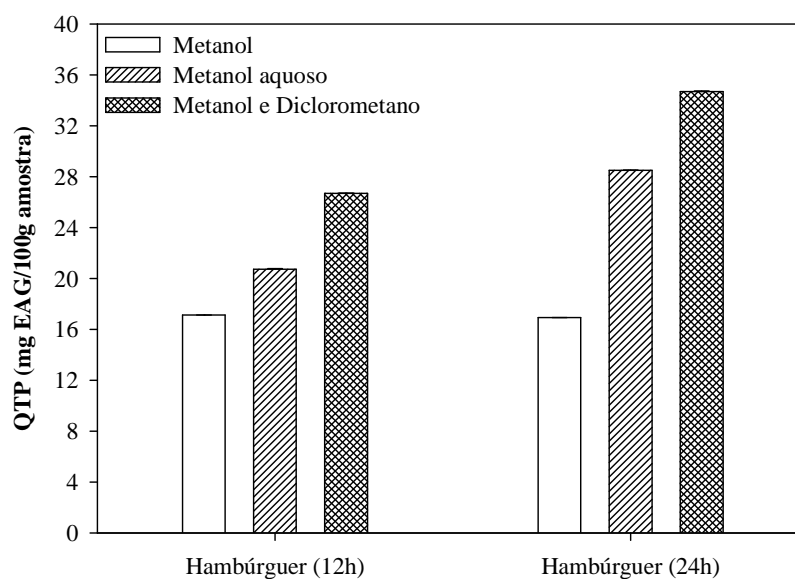


Figura 5 - Quantificação total de polifenóis dos extratos obtidos de hambúrgueres de pata-roxa após 12h e 24h de extração com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

3.1.1.3. Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC)

O método ORAC baseia-se na degradação da fluoresceína em produtos não fluorescentes, que é induzida pelos radicais peróxido (ROO^{\bullet}) gerados pelo composto AAPH a 37°C (Prior *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2013). A prevenção da degradação da fluoresceína depende da capacidade dos compostos da amostra em análise em doar átomos de hidrogénio aos radicais ROO^{\bullet} , impedindo que reajam com a fluoresceína (Prior *et al.*, 2005). O Trolox, um derivado polar do α -tocoferol ou vitamina E (Poljšak e Raspor, 2008), foi o antioxidante utilizado como padrão. Para a curva-padrão, utilizaram-se as concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e $80\mu\text{M}$ de Trolox. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por 100 gramas de amostra e encontram-se presentes nas Figuras 6 e 7.

Verifica-se que os extratos dos hambúrgueres (obtidos após 12 horas de extração) apresentaram uma maior capacidade de redução de radicais ROO^{\bullet} , nomeadamente 8603,01, 9274,58 e $1766,02\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ em contrapartida aos 1003,22, 479,96 e $681,96\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para os extratos de pata-roxa, para extrações com metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente (Figura 6). O extrato de metanol com diclorometano apresentou diferenças estatisticamente significativas no hambúrguer, em relação aos outros extratos ($p \leq 0,05$, ANOVA). Entre as duas amostras (pata-roxa e hambúrguer de pata-roxa), as diferenças também foram significativas ($p \leq 0,05$, *t-student*).

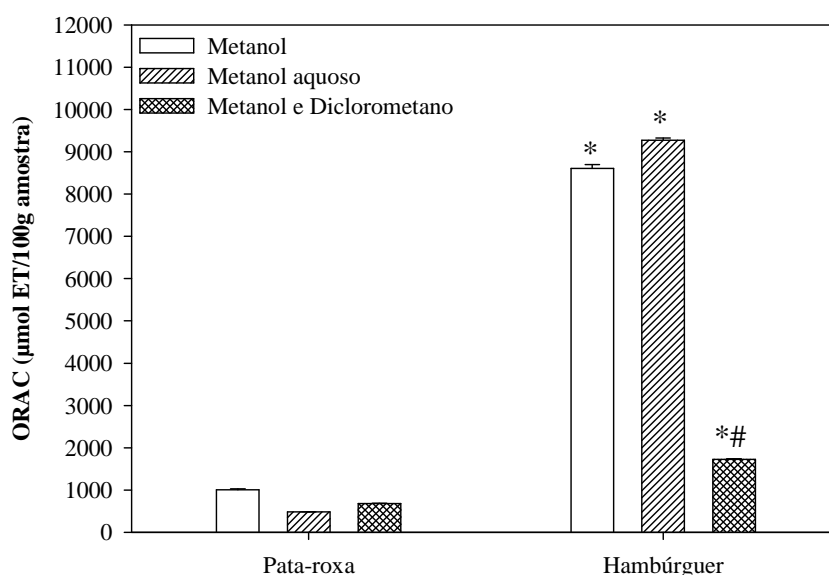


Figura 6 - Capacidade de redução de radicais peróxido dos extratos obtidos a partir de hambúrguer ou pata-roxa (controlo) com diferentes solventes após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média \pm SEM ($n=3$). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres e os valores dos extratos de pata-roxa (*t-student*). # $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres (ANOVA).

A capacidade de reduzir radicais de oxigénio dos vários extratos não revelou diferenças estatisticamente significativas na variação da duração da extração (12h e 24h, $p \geq 0,05$, *t-student*, Figura 7). Obtiveram-se 8597,80, 10009,50 e 1961,52 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para os extratos de 24h de extração com metanol, metanol aquoso e metanol com diclorometano, respetivamente. Estes resultados apenas apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao comparar os diferentes extratos ($p \leq 0,05$, ANOVA).

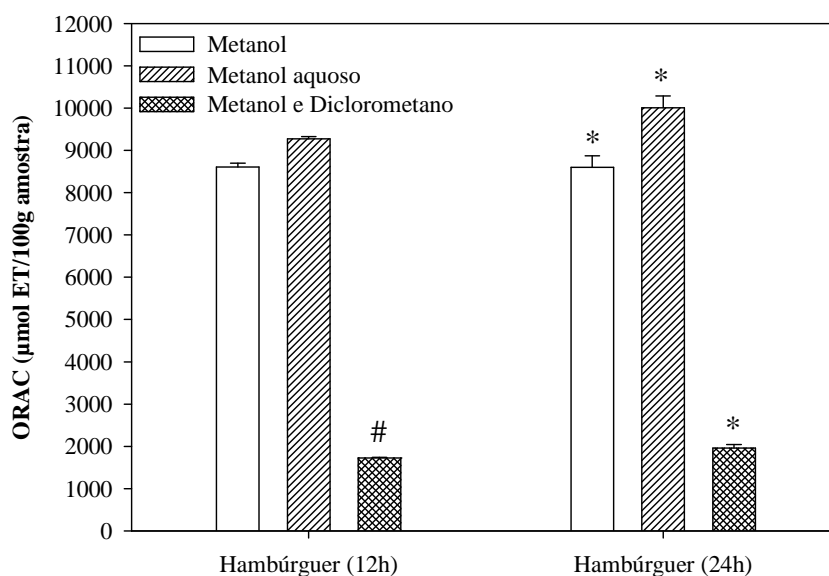


Figura 7 - Capacidade de redução de radicais peróxido dos extratos obtidos de hambúrgueres de pata-roxa após 12h e 24h de extração com diferentes solventes. Os valores correspondem à média \pm SEM ($n=3$). # $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres obtidos após 12h de extração (ANOVA). * $p \leq 0,05$ representam diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos extratos dos hambúrgueres obtidos após 24h de extração (ANOVA).

3.1.2. Avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativo

3.1.2.1. Atividade citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram revelados pelo método da calceína-AM, um composto fluorescente que, quando esterificado, perde a fluorescência. No entanto, a forma esterificada tem capacidade para penetrar nas membranas celulares. Quando tal ocorre, o composto sofre a ação de esterases citoplasmáticas, que clivam as ligações estéres, e a calceína-AM retoma o seu estado naturalmente fluorescente. Este processo ocorre somente nas células viáveis; nas células mortas, a calceína-AM não sofre a desesterificação pelas esterases. Quanto maior for o nível de fluorescência detetado, maior é o número de células viáveis (Hayes e Kruger, 2014).

No presente trabalho, procedeu-se à avaliação do efeito citotóxico dos extratos de pata-roxa e de hambúrgueres de pata-roxa na linha celular MCF-7. Os resultados foram expressos em percentagem do controlo e encontram-se presentes nas Figuras 8 e 9.

Da análise dos resultados obtidos (Figura 8), verifica-se que os extratos dos hambúrgueres de pata-roxa a 1mg/mL (obtidos após 12 horas de extração) apresentaram um efeito citotóxico sobre as células MCF-7, tendo sido detetado somente 0,99%, 1,11% e 1,11% de células viáveis na presença dos extratos de metanol, metanol aquoso, e metanol com diclorometano, respetivamente. Por outro lado, os extratos de pata-roxa não apresentaram qualquer tipo de efeito citotóxico. Os extratos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quer para a pata-roxa, quer para o hambúrguer ($p \geq 0,05$, ANOVA), contudo as diferenças foram significativas entre os dois tipos de amostras ($p \leq 0,05$, *t-student*).

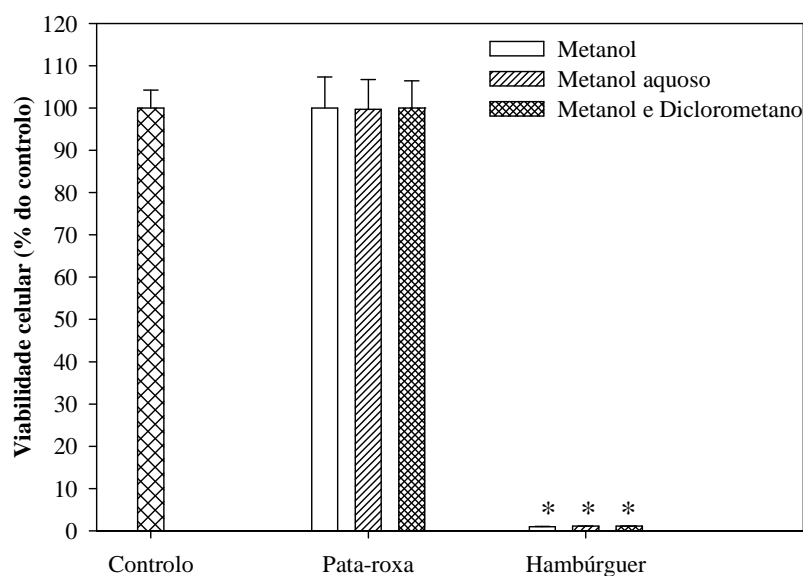


Figura 8 - Efeito citotóxico dos diferentes extratos de hambúrguer e de pata-roxa (1mg/mL) sobre a viabilidade celular das células MCF-7 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos dos hambúrgueres em relação ao controlo (*t-student*).

Contudo, não se verificou o mesmo efeito citotóxico quando as células foram incubadas com concentrações mais baixas (10, 30 e 100 μ g/mL) de extratos de hambúrguer de pata-roxa (Figura 9), obtendo-se 100%, 97,30% e 81,71% de células viáveis na presença do extrato de metanol; 96,87%, 100% e 100% de células viáveis na presença do extrato de metanol aquoso; e 97,34%, 97,20% e 98,59% de células viáveis na presença do extrato de metanol com diclorometano para as concentrações finais de 10, 30 e 100 μ g/mL, respetivamente. Estes

resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p \geq 0,05$, *t-student*).

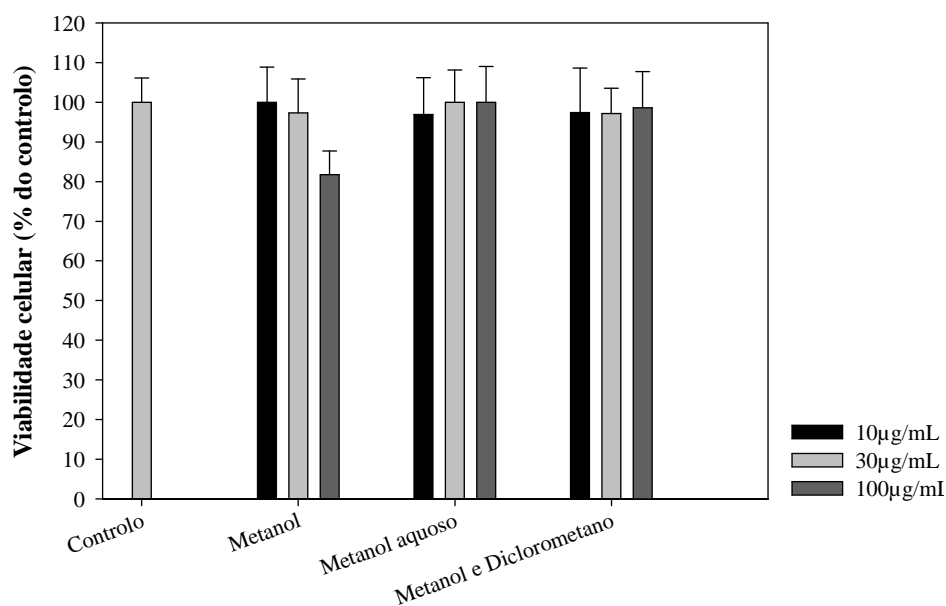


Figura 9 - Efeito citotóxico dos extratos de hambúrguer de pata-roxa a diferentes concentrações de (10-100µg/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8).

3.1.2.2. Atividade antiproliferativa

Os ensaios de proliferação celular foram revelados pelo método de MTT, um composto fluorescente de cor amarela que consegue atravessar a membrana celular. Quando as células estão viáveis, o MTT é convertido pela succinato desidrogenase mitocondrial em formazan, que se vai acumulando no interior da célula. É característico pela sua cor púrpura e detetável por espectrofotometria a 570nm. Quanto maior a quantidade de formazan detetada, maior o número de células viáveis. Este processo só é possível se as células se encontrarem viáveis; em células inviáveis, a enzima mitocondrial não terá atividade para converter o MTT (Riss *et al.*, 2004).

No presente trabalho, avaliou-se a atividade antiproliferativa dos extratos de pata-roxa e de hambúrguer de pata-roxa na linha celular MCF-7. Os resultados foram apresentados em percentagem do controle e estão presentes nas Figuras 10 e 11.

Verificou-se que os extratos dos hambúrgueres de pata-roxa a 1mg/mL (obtidos após 12 horas de extração) apresentaram um efeito antiproliferativo sobre as células MCF-7, tendo sido detetados somente 0%, 19,08% e 0% de células viáveis com os extratos de metanol, metanol aquoso, e metanol com diclorometano, respetivamente (Figura 10). Por outro lado, os

extratos de pata-roxa não apresentaram efeito antiproliferativo estatisticamente significativos ($p \geq 0,05$, *t-student*) em relação ao controlo, embora os extratos metanol aquoso e metanol com diclorometano tenham exibido uma inibição da proliferação celular de 10% e 11%, respetivamente.

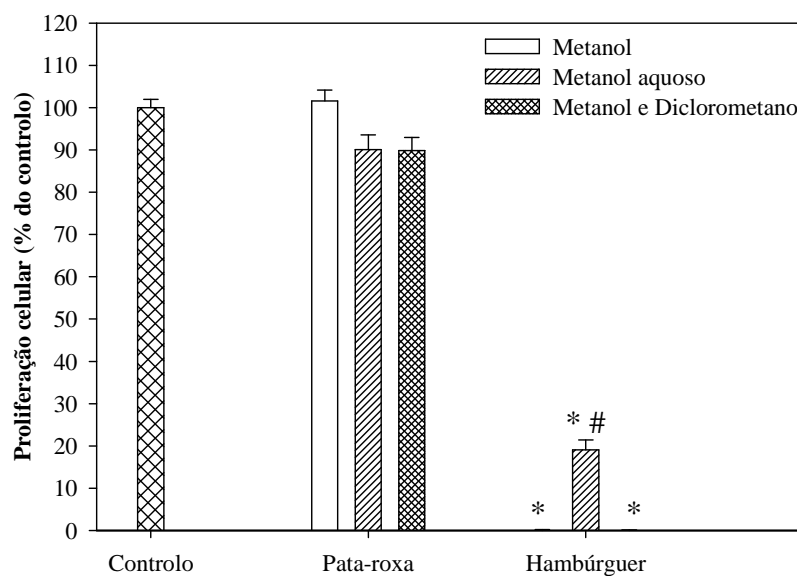


Figura 10 - Efeito antiproliferativo dos extratos de hambúrguer e de pata-roxa (1mg/mL) sobre a viabilidade celular das células MCF-7 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos do hambúrguer em relação ao controlo (*t-student*). # $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas entre os diferentes extratos de hambúrguer de pata-roxa (ANOVA).

Contudo, quando as células foram incubadas com concentrações mais baixas (10, 30 e 100 μ g/mL), não se observou o mesmo efeito antiproliferativo dos extratos de hambúrguer de pata-roxa (Figura 11); obteve-se uma proliferação celular próxima de 100% nas diferentes situações. Estes resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ($p \geq 0,05$, *t-student*).

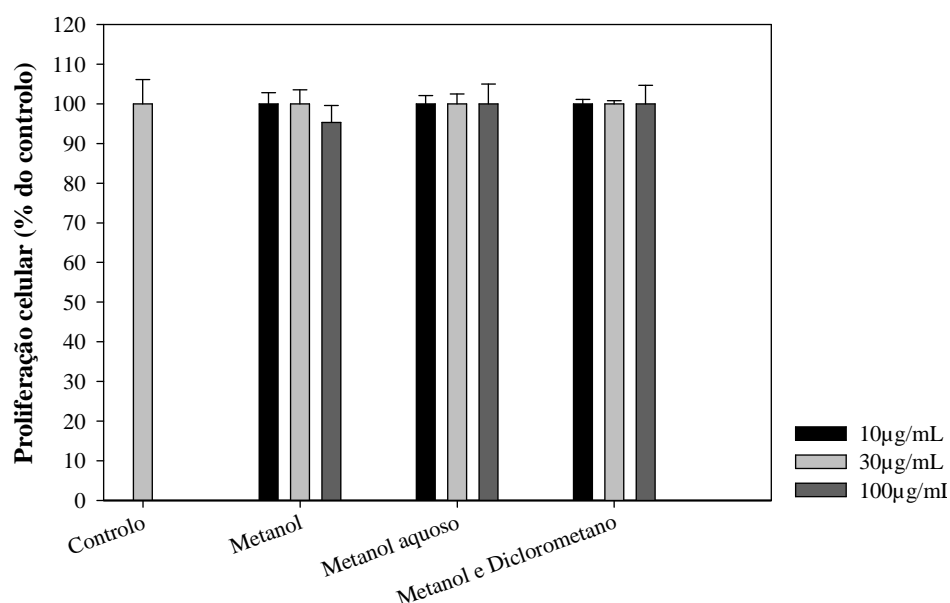


Figura 11 - Efeito antiproliferativo dos extratos de hambúrguer nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem \pm SEM (n=8).

3.2. Hambúrgueres de pata-roxa com tratamento térmico

O efeito do tratamento térmico sobre os compostos antioxidantes do hambúrguer de pata-roxa foi testado. Os hambúrgueres tratados termicamente e os hambúrgueres crus (controlo) foram submetidos ao mesmo tipo de extração líquido-sólido com metanol durante 12 horas.

3.2.1. Avaliação da capacidade antioxidante

Na Figura 12 estão representados os resultados do efeito do tratamento térmico (amostra cozinhada) sobre os diferentes parâmetros usados para a caracterização do potencial antioxidante e do conteúdo fenólico do hambúrguer de pata-roxa. Verificou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$, *t-student*) na capacidade de redução do radical DPPH de 79,48% da amostra crua para 87,36% da amostra cozinhada; e não houve alterações significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*) na quantidade total de polifenóis entre a amostra crua e a amostra cozinhada de 32,91mg EAG/100g e 31,81mg EAG/100, respetivamente; não se verificou diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*) na capacidade absorção de radicais de oxigénio, contudo observou-se uma tendência para os valores diminuírem após o

tratamento térmico: 3895,15 μ mol TE/100g na amostra crua, e 2567,27 μ mol TE/100g na amostra cozinhada.

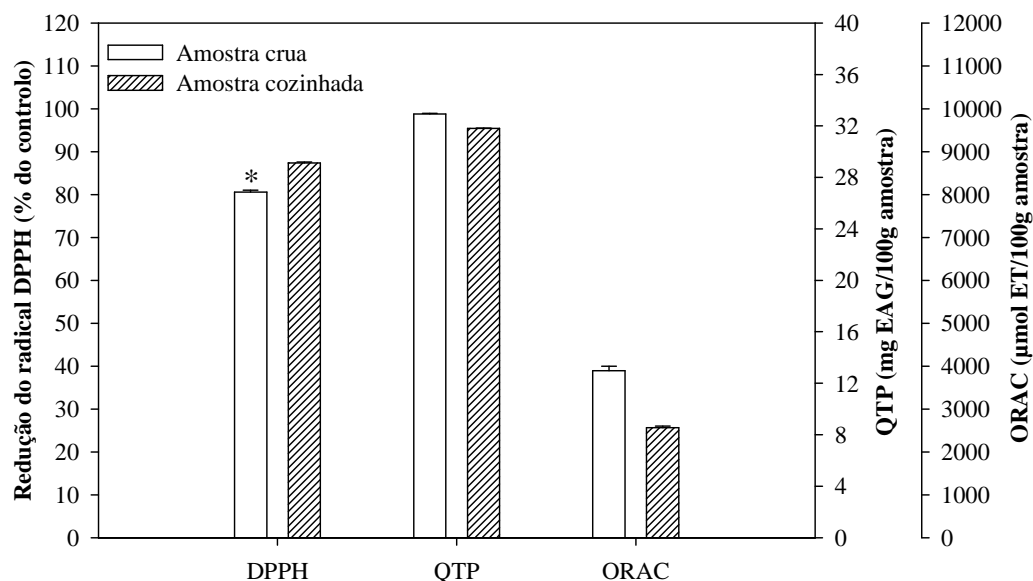


Figura 12 - Capacidade de redução do radical DPPH (% do controlo), QTP (mg EAG/100g amostra) e ORAC (μ mol ET/100g amostra) dos extratos metanólicos a 1mg/mL de hambúrgueres crus e cozinhados (20minutos a 180°C) após 12 horas de extração. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas para o hambúrguer cozinhado em relação ao hambúrguer cru (*t-student*).

Na Figura 13, está representada a dependência da concentração do extrato das amostras crua e cozinhada, da qual foi possível determinar os valores de EC_{50} (Tabela 2). Averiguou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*) entre os valores das duas amostras, no entanto, o extrato do hambúrguer cozinhado mostrou tendência para ter um valor de EC_{50} mais baixo (300,04 μ g/mL) em comparação ao hambúrguer cru (338,70 μ g/mL).

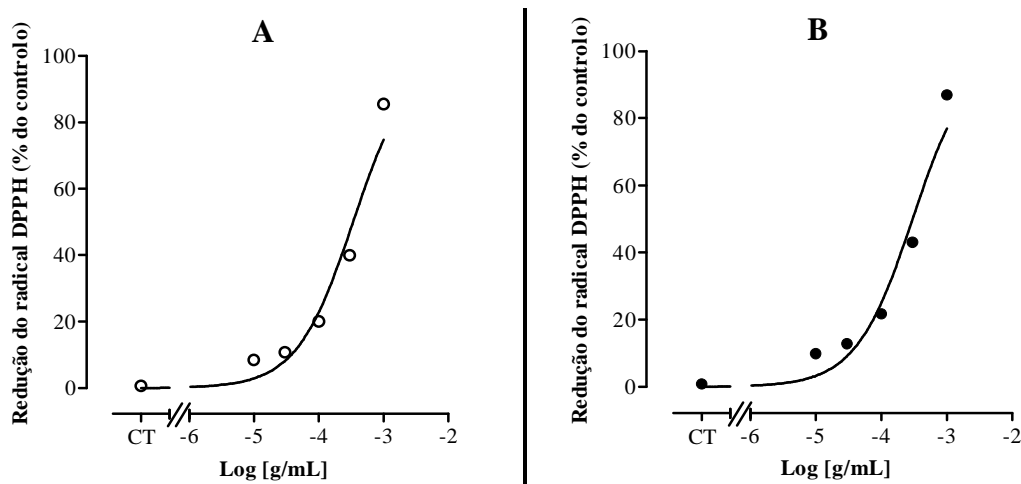


Figura 13 - Dependência da concentração (10-1000µg/mL) dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa A) crus e B) cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração, que reduziram a atividade do radical DPPH em mais do que 50% a uma concentração de 1mg/mL. CT: controlo. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final ± SEM (n=12).

Tabela 2 - Valores médios de EC₅₀ [min; máx] (n=12) para os extratos obtidos a partir de hambúrgueres crus e cozinhados que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH superior a 50%.

Tipo de Amostra	EC₅₀ (µg/mL)
Hambúrguer cru	338,70 [329,10; 408,80]
Hambúrguer cozinhado	300,04 [270,20; 334,00]

3.2.2. Avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativo

Foi testado o efeito do tratamento térmico sobre a capacidade citotóxica e antiproliferativa dos hambúrgueres de pata-roxa na linha celular MCF-7. Os resultados expressos em percentagem do controlo e estão presentes nas Figuras 14, 15 e 16. À concentração de 1mg/mL, foram detetados 1,1% e 1,0% de células viáveis para as amostras cruas e cozinhadas, respetivamente, no ensaio de citotoxicidade, enquanto para o ensaio de proliferação celular, foi detetado 0% de células viáveis para ambos os tipos de amostras (Figura 14).

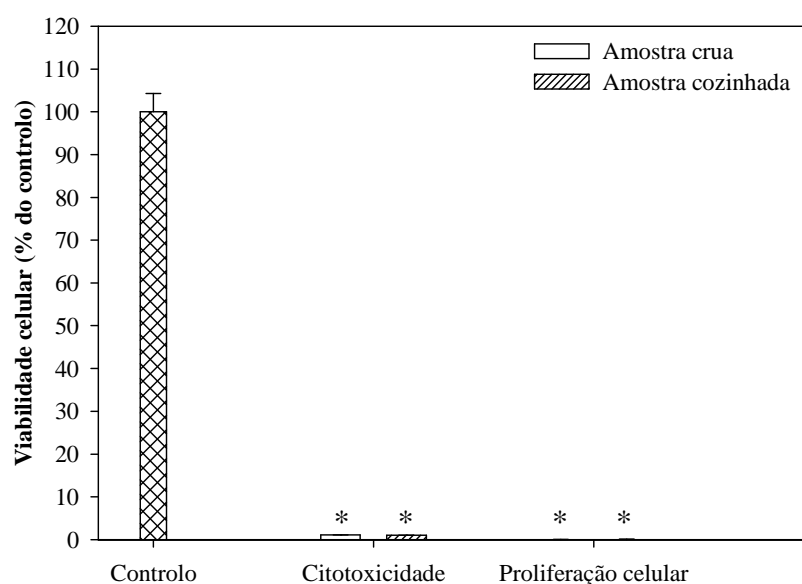


Figura 14 - Atividades citotóxica e antiproliferativa dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a 1mg/mL em células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM e do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem da redução final \pm SEM (n=12). * $p \leq 0,05$ representa diferenças estatisticamente significativas detetadas nos extratos de hambúrguer em relação ao controlo (*t-student*).

Não se verificaram os mesmos efeitos citotóxico e antiproliferativo observados anteriormente, quando as células foram incubadas com concentrações mais baixas (10, 30 e 100 μ g/mL) de extratos de hambúrguer de pata-roxa cru e cozinhado (Figuras 15 e 16). Obtiveram-se 100% de células viáveis em quase todas as situações. Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo ($p \geq 0,05$, *t-student*).

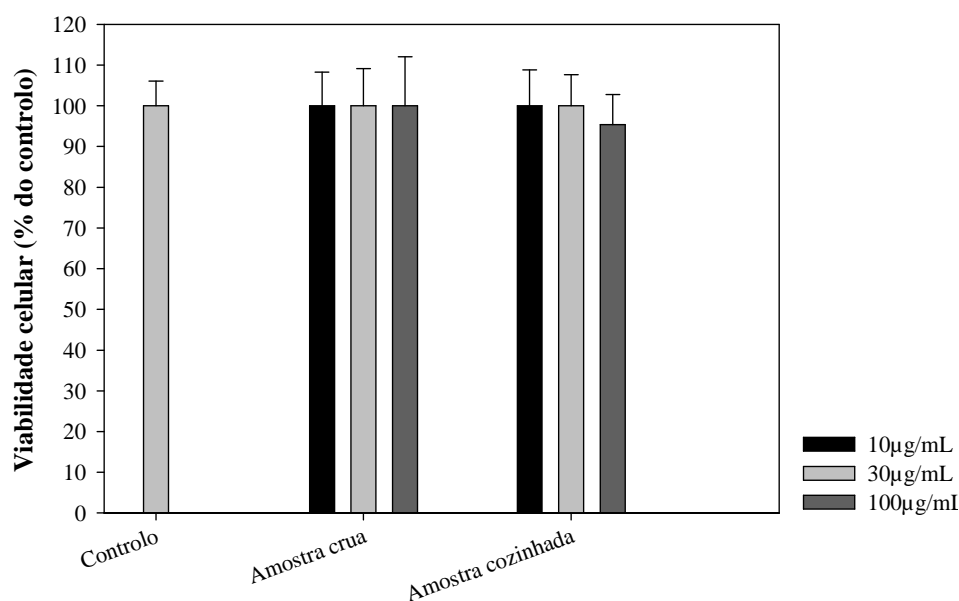


Figura 15 - Efeito citotóxico dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a diferentes concentrações (10-100µg/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de calceína-AM. Os valores correspondem à média da percentagem ± SEM (n=8).

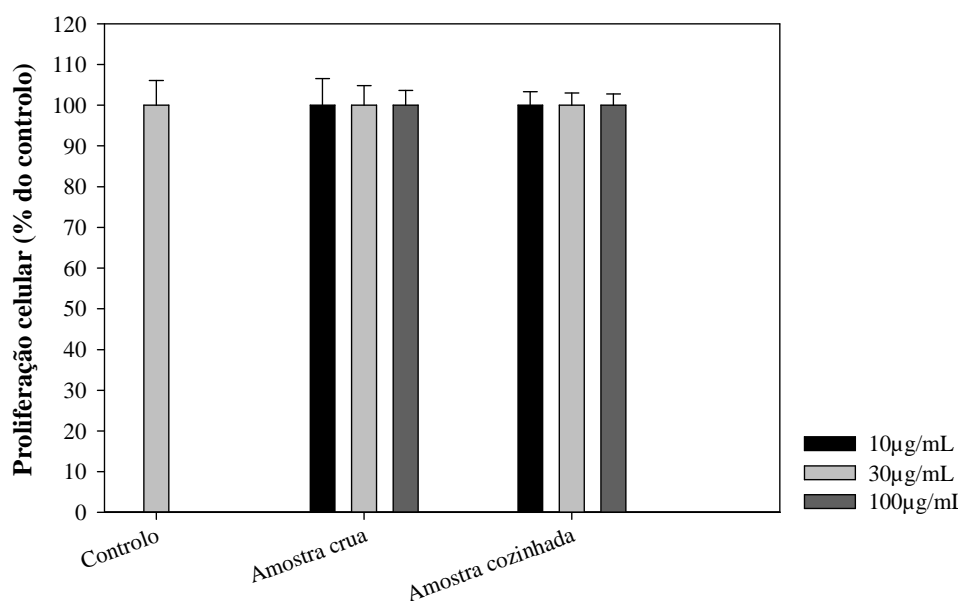


Figura 16 - Efeito antiproliferativo dos extratos metanólicos de hambúrgueres de pata-roxa crus e cozinhados (20 minutos a 180°C) após 12h de extração a diferentes concentrações (10-100µg/mL) nas células MCF-7 após 24h de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média da percentagem ± SEM (n=8).

3.3. Avaliação da estabilidade após embalamento a vácuo

3.3.1. Estudo microbiológico

O estudo ocorreu durante 14 dias, durante os quais o lote de hambúrgueres de pata-roxa (lote 3) e os respetivos controlos foram mantidos em refrigeração 10,25°C [7,70°C; 14,30°C]. Como a principal matéria-prima que constitui o hambúrguer é o pescado, foi considerado o critério microbiológico aplicado a pescado cru e/ou congelado cujo limite máximo aceite para as contagens aeróbias “totais” é 10⁷ufc/g (Huss, 1993; IFST,1999) e para a *E.coli* é 500ufc/g (Huss, 1993).

3.3.1.1. Contagens de microrganismos viáveis “totais” e degradativos

As contagens viáveis “totais” são definidas como sendo o número de bactérias (em ufc/g) num produto alimentar obtido sob condições ótimas de crescimento. Não se trata de um parâmetro para obter a população microbiana total presente na massa de alimento estudada, mas apenas uma fração dos microrganismos que se desenvolve no meio de cultura e nas condições de incubação escolhidos (Huss, 1993). As contagens de microrganismos “totais” e degradativos foram realizados em meio *Iron Agar (Lingby)*, que é o mais indicado para amostras de pescado ou derivados de pescado (Atlas, 2010). Ao possuir uma percentagem baixa de sal (0,5% de NaCl), este meio de cultura potencia o desenvolvimento de microrganismos halófilos ligeiros (que, embora necessitem de sal, desenvolvem-se em meios com baixo teor de NaCl) e os halotolerantes ligeiros (toleram a presença de sal). Entre estes microrganismos, encontram-se aqueles que são degradativos, isto é, são capazes de reduzir o sulfito de sódio (Na₂SO₃) a H₂S. O citrato de ferro presente no meio de cultura reage com o H₂S e escurece as colónias formadas, permitindo uma identificação visual deste tipo de microrganismos (Baross, 1992; Atlas, 2010).

No presente estudo, fizeram-se as contagens para microrganismos aeróbios (Figura 17) e anaeróbios (Figura 18). Constata-se que as contagens iniciais para a pata-roxa foram altas (2,00x10⁶ufc/g para os aeróbios “totais” e 6,90x10⁵ufc/g para os aeróbios degradativos), ao passo que as contagens para o hambúrguer foram significativamente mais baixas (2,03x10²ufc/g para o aeróbios “totais” e 4,55x10²ufc/g para os aeróbios degradativos) (p≤0,05, *t-student*, Figura 17). É possível observar que o desenvolvimento microbiano no hambúrguer foi mais lento ao longo do estudo, ultrapassando o critério microbiológico (10⁷ufc/g de aeróbios “totais”) apenas ao 8º dia de armazenamento em refrigeração, enquanto

a pata-roxa ultrapassou-o ao 4º dia. Os restantes parâmetros microbiológicos foram analisados somente no período de tempo em que as amostras se encontravam abaixo do critério microbiológico (2 dias para a pata-roxa e 6 dias para o hambúrguer).

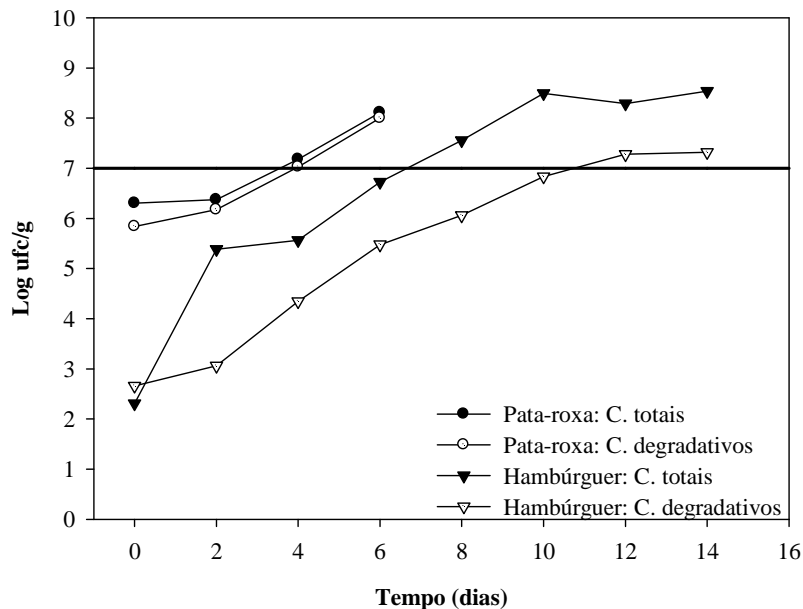


Figura 17 – Contagens (C.) de microrganismos aeróbios “totais” e degradativos incubados a uma temperatura média de 22,2°C [21,50°C; 24,10°C] durante 3 dias presentes na pata-roxa e no hambúrguer ao longo do tempo. O limite máximo aceite de microrganismos aeróbios presentes nas amostras foi 10^7 ufc/g. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$, *t-student*) nas contagens de microrganismos aeróbios “totais” e degradativos entre as amostras para os tempos 0, 2, 4 e 6 dias.

O desenvolvimento anaeróbio (figura 18) não apresentou diferenças significativamente significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*) do que foi observado para o desenvolvimento aeróbio. As contagens iniciais para a pata-roxa também foram altas ($7,55 \times 10^5$ ufc/g para os anaeróbios “totais” e $5,25 \times 10^5$ ufc/g para os anaeróbios degradativos), ao passo que as contagens para o hambúrguer foram significativamente mais baixas ($2,30 \times 10^4$ ufc/g para o anaeróbios “totais” e $4,50 \times 10^2$ ufc/g para os anaeróbios degradativos) ($p \leq 0,05$, *t-student*). Também se observou um desenvolvimento microbiano anaeróbio mais lento no hambúrguer em relação à pata-roxa.

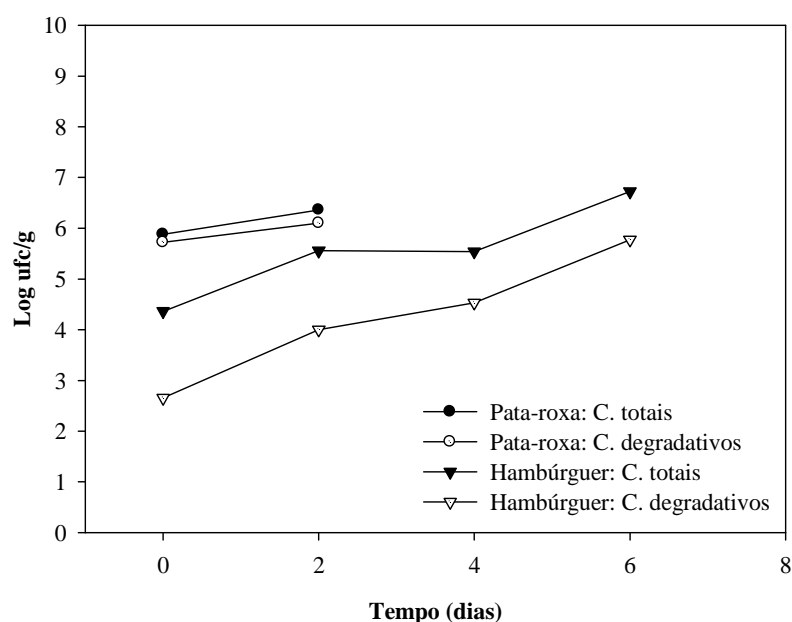


Figura 18 – Contagens (C.) de microrganismos anaeróbios “totais” e degradativos incubados a uma temperatura média de 22,2°C [21,50°C; 24,10°C] durante 3 dias presentes na pata-roxa e no hambúrguer durante 2 e 6 dias de refrigeração, respetivamente. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas nas contagens de microrganismos anaeróbios “totais” e degradativos, entre as amostras, para os tempos 0 e 2 dias ($p \leq 0,05$, *t-student*).

3.3.1.2. Esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

As bactérias do género *Clostridium* são bactérias anaeróbicas mesófilas (capazes de crescer entre 15°C a 40°C) que sofrem esporulação em situações de *stress*. É possível ocorrer contaminações com estirpes patogénicas de *Clostridium*, nomeadamente a *C. botulinum* (que provoca o botulismo), a partir de pescado, e *C. perfringens* (que provoca intoxicações alimentares), a partir de alimentos que foram, por exemplo, colhidos da terra (Johnson, 2009). Os esporos são resistentes ao calor, pelo que o tratamento térmico do alimento por vezes não assegura a sua destruição. Germinam quando surgem as condições ideais, nomeadamente no trato intestinal humano, possibilitando o surgimento das doenças acima referidas (Johnson, 2009). A técnica aplicada para a pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores permite detetar estas duas estirpes patogénicas (embora não permita identificá-las), porque o meio SPS contém na sua composição citrato de ferro que, ao reagir com H₂S que as duas estirpes produzem, escurece as colónias formadas (Atlas, 2010).

No presente estudo, os esporos de *Clostridium* sulfito-redutores apenas foram detetados em 1g de hambúrguer de pata-roxa armazenado em refrigeração nos dias 4 e 6.

3.3.1.3. Enterobactérias

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas que, na sua maioria, são anaeróbios facultativos (conseguem sobreviver sem oxigénio, mas quando presente, é usado) e podem ser encontrados no trato intestinal dos animais. Causam deterioração em diferentes tipos de alimentos, incluindo em peixe e vegetais (Baylis *et al.*, 2011). Nesta família estão incluídos diversos patogénicos associados a intoxicações alimentares graves, nomeadamente *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* e *Serratia* (Baylis *et al.*, 2011). Por este motivo, este parâmetro tem vindo a ser usado não só como indicador de higiene, mas também como indicador da possível presença de patogénicos no alimento (Baylis *et al.*, 2011). No presente estudo, o meio de cultura VRBG foi usado por ser o indicado para a enumeração de microrganismos pertencentes à Enterobacteriaceae (Atlas, 2010).

Na Figura 19 estão apresentadas os resultados da pesquisa de enterobactérias na pata-roxa e no hambúrguer. Constata-se que o crescimento microbiano variou pouco para a pata-roxa ao fim de dois dias de refrigeração, mantendo-se entre $2,45 \times 10^4$ ufc/g e $3,90 \times 10^4$ ufc/g. No caso do hambúrguer, o desenvolvimento microbiano manteve-se entre $7,10 \times 10^3$ ufc/g e $2,90 \times 10^4$ ufc/g e só aumentou a partir do 4º dia, atingindo $1,39 \times 10^5$ ufc/g no 6º dia. Entre os dois tipos de amostras, as contagens de enterobactérias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, *t-student*).

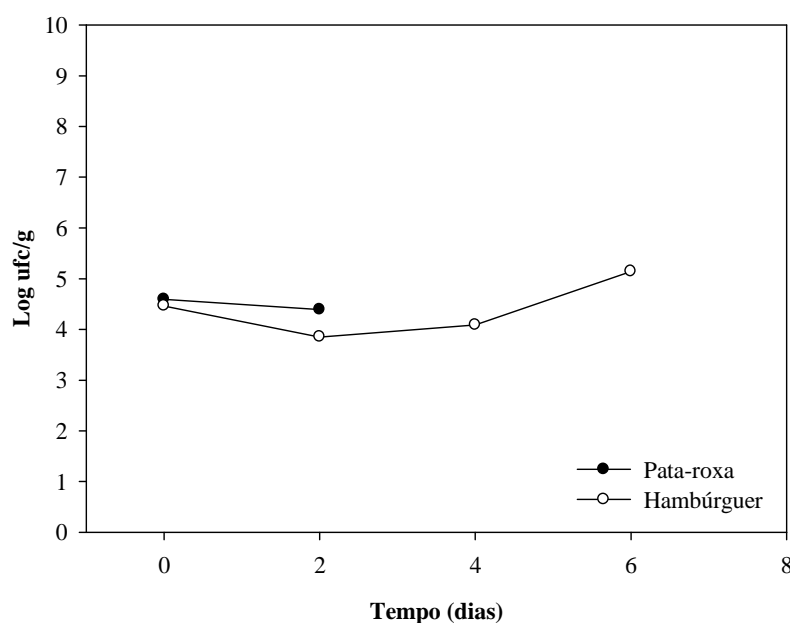


Figura 19 - Crescimento de enterobactérias a 30°C durante 24h presentes na pata-roxa e no hambúrguer em refrigeração ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Para os tempos 0 e 2 dias, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras ($p \geq 0,05$, *t-student*).

Todos os testes de confirmações realizados (teste de oxidase e crescimento em caldo Dextrose BCP) confirmaram a presença de enterobactérias (oxidase negativa e glucose positiva).

3.3.1.4. Pesquisa de *E. coli*

A *E. coli*. é um microrganismo mesófilo que pertence à família Enterobacteriaceae e pode ser encontrado exclusivamente na flora intestinal de animais de sangue quente, incluindo seres humanos. A sua presença no ambiente está, por isso, associada à libertação de fezes (Paruch e Mæhlum, 2012). Devido à simplicidade e rapidez dos métodos de deteção de *E. coli*, trata-se do indicador ideal para detetar possíveis contaminações com matéria fecal em alimentos (Baylis *et al.*, 2011). Embora hajam estirpes de *E. coli* que são habitualmente comuns entre indivíduos e podem não afetar a saúde pública, por outro lado, existem estirpes patogénicas, como as *Verocytotoxic E. coli*, que provocam gastroenterites severas, diarreias sangrentas e falha nos rins e fígado. Assim, para além de ser um indicador de qualidade higiénica, é também um parâmetro de segurança alimentar (Baylis *et al.*, 2011; Paruch e Mæhlum, 2012). O meio de cultura utilizado (TBX) possui na sua composição o substrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida que, ao ser absorvido pela *E. coli* e clivado pela enzima β -D-glucuronidase, confere à colónia uma coloração azul-esverdeada (Atlas, 2010).

Ao longo do presente estudo, foram detetadas $1,0 \times 10^1$ ufc *E. coli* por 1g de pata-roxa nos dias 0 e 2, e $1,0 \times 10^1$ ufc *E. coli* por 1g de hambúrguer no dia 2, quando armazenados em refrigeração. Os resultados não ultrapassaram o limite máximo do critério microbiológico (500 ufc/g).

3.3.1.5. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é um microrganismo mesófilo que pertence à família Enterobacteriaceae e pode ser encontrado em diferentes tipos de hospedeiros, tais como mamíferos, aves, peixes e reptéis (Baylis *et al.*, 2011). Provoca desde gastroenterites comuns (diarreia, dores abdominais e febre) a febre tifoide, que pode ser mortal. A ação patogénica deste microrganismo pode ser prevenida com boas práticas de higiene e bons processos de refrigeração e cozedura dos alimentos, uma vez que o tratamento térmico dos alimentos é o suficiente para eliminar a *Salmonella* (Gianella, 1996; Baylis *et al.*, 2011).

A detecção de *Salmonella* pelo sistema miniVIDAS[®] baseia-se no método imuno-enzimático fluorescente (*Enzyme Linked Fluorescent Assay* - ELFA). O conceito consiste na ligação de um antigénio específico à *Salmonella* a um anticorpo específico que, por sua vez, é detetado através de um segundo anticorpo que, ao reagir com um determinado substrato, origina uma mudança de fluorescência que é posteriormente detetada (Yolken e Stopa, 1979; Gan e Patel, 2013).

Ao longo do presente estudo, a *Salmonella spp.* não foi detetada em 25 gramas de pata-roxa ou 25g de hambúrguer armazenados em refrigeração ao longo do estudo.

3.3.2. Índice de TBA

A peroxidação lipídica é uma das causas principais de deterioração dos alimentos com elevado teor lipídico e os compostos secundários formados durante este processo são responsáveis pelo cheiro e sabor desagradáveis associados à degradação de alimentos (Niki *et al.*, 2005). A determinação do índice de TBA baseia-se na extração do composto secundário MDA e da formação de um complexo rosado entre o MDA e duas moléculas de 2-ácido tiobarbitúrico, que é detetável por espectrometria a 530nm (Dahle *et al.*, 1962). Como tal, trata-se de um parâmetro comum para avaliar o estado de degradação oxidativa de um produto alimentar.

Os resultados da humidade da pata-roxa e do hambúrguer de pata-roxa estão apresentados na Tabela 3, necessários para a determinação do índice de TBA das amostras. Os valores determinados estão representados na Figura 20.

A pata-roxa possuiu uma humidade inicial de 76,3% e sofreu um aumento de humidade em 2,0%; o hambúrguer possuiu uma humidade inicial de 71,3% e sofreu uma perda de humidade em 1,7% (Tabela 3). A humidade das duas amostras não teve uma variação estatisticamente significativa ao longo do tempo ($p \geq 0,05$, ANOVA).

Tabela 3 -Valores de humidade em percentagem para a pata-roxa e para o hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=2).

Tempo (dias)	Pata-roxa (%)	Hambúrguer de pata-roxa (%)
0	76,37 \pm 0,32 ^d	71,04 \pm 0,32
2	78,33 \pm 0,67 ^d	67,52 \pm 0,52
4	-	69,89 \pm 0,85
6	-	69,63 \pm 0,09

Diferenças estatisticamente significativas ^a em relação ao dia 0; ^b em relação ao dia 2; ^c em relação ao dia 4 ($p \leq 0,05$, ANOVA). ^d Diferenças estatisticamente significativas para a pata-roxa em relação ao hambúrguer para o mesmo tempo ($p \leq 0,05$, *t-student*).

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos até ao 6º dia das amostras em refrigeração. A pata-roxa apresentou 0,585mg e 0,503mg MDA/1000g para os dias 0 e 2, respetivamente; o hambúrguer apresentou 1,407mg, 1,691mg, 1,435mg e 1,612mg MDA/1000g para os dias 0, 2, 4 e 6, respetivamente. Os resultados entre ambas as amostras são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$, *t-student*). Ao longo do tempo, a variação do índice de TBA não foi estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$, ANOVA).

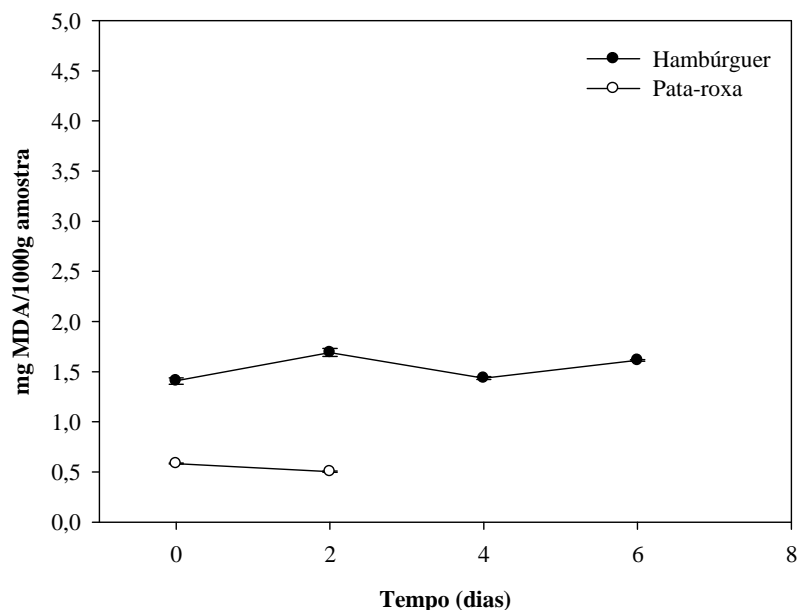


Figura 20 - Variação do índice de TBA da pata-roxa e do hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias de refrigeração, respetivamente. Os valores correspondem à média \pm SEM ($n=4$). O índice de TBA não variou significativamente ao longo do tempo ($p \geq 0,05$, ANOVA). Para os tempos 0 e 2 dias, existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras ($p \leq 0,05$, *t-student*).

3.3.3. Leitura da Cor

A cor é qualquer comprimento de onda na gama da luz visível (380 a 750nm) que é detetada pelo olho humano. Como é um parâmetro muito subjetivo, foi desenvolvido um instrumento de leitura que traduzisse a cor em escala numérica para melhorar a perceção da qualidade alimentar do produto (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2002).

Verificou-se um ligeiro decréscimo dos valores de L^* correspondente ao escurecimento da cor para ambos os tipos de amostras e os valores indicam que a pata-roxa sofreu um maior escurecimento na cor do que o hambúrguer entre o dia 0 e 2 (Tabela 4). Em relação aos valores de a^* , os valores são positivos, pelo que ambas as amostras encontram-se na gama dos tons avermelhados. Quer o hambúrguer, quer a pata-roxa sofrem um pequeno decréscimo neste parâmetro entre o dia 0 e 2, embora se tenha detetado valores estatisticamente superiores

Resultados

($p \leq 0,05$, *t-student*) para o hambúrguer nos dias 4 e 6. Em relação aos valores de b^* , os valores são positivos, pelo que ambas as amostras se encontram na gama dos tons azulados, mas verificou-se que a pata-roxa sofreu uma variação mais acentuada neste parâmetro do que no hambúrguer entre os dias 0 e 2.

Tabela 4 - Valores de L^* , a^* e b^* para a pata-roxa e para o hambúrguer ao longo de 2 e 6 dias, respetivamente. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=12).

Tempo (dias)	Pata-roxa			Hambúrguer de pata-roxa		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
0	59,33 \pm 1,17 ^d	6,91 \pm 0,46	14,16 \pm 0,45 ^d	51,31 \pm 0,69	7,61 \pm 0,20	49,64 \pm 0,57
2	50,74 \pm 0,30 ^a	2,85 \pm 0,40 ^{a,d}	6,93 \pm 0,38 ^{a,d}	50,77 \pm 0,30	6,85 \pm 0,22	47,17 \pm 0,51 ^a
4	-	-	-	48,05 \pm 0,45 ^{a,b}	9,48 \pm 0,46 ^{a,b}	46,23 \pm 0,26 ^{a,b}
6	-	-	-	45,57 \pm 0,26 ^{a,b}	9,03 \pm 0,21 ^{a,b}	43,36 \pm 0,65 ^{a,b,c}

^d Diferenças estatisticamente significativas para a pata-roxa em relação ao hambúrguer para o mesmo tempo ($p \leq 0,05$, *t-student*).

Constatou-se uma diferença total significativa na cor da pata-roxa e do hambúrguer ao fim de 2 e 6 dias, respetivamente (Tabela 5). Em relação à vivacidade da cor (C_{ab}), verifica-se uma diminuição dos valores para a pata-roxa e para o hambúrguer. A tonalidade da cor (h_{ab}) não sofreu diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, ANOVA) ao fim de 2 dias de refrigeração para ambas as amostras. Em comparação, a pata-roxa sofreu uma variação maior na cor ($\Delta E = 13,26 \pm 0,99$) com uma perda mais acentuada na vivacidade da cor do que o hambúrguer ($\Delta E = 4,37 \pm 0,73$) ao fim de 2 dias de refrigeração.

Tabela 5 - Parâmetros da leitura da cor para a pata-roxa e para o hambúrguer determinados a partir dos valores de L^* , a^* e b^* . Os valores correspondem à média \pm SEM (n=12).

Tempo (dias)	Pata-roxa			Hambúrguer de pata-roxa		
	ΔE	C_{ab}	h_{ab} (°)	ΔE	C_{ab}	h_{ab} (°)
0	-	15,76 \pm 0,58 ^d	64,72 \pm 0,44 ^d	-	50,18 \pm 0,55	81,05 \pm 0,21
2	13,26 \pm 0,99 ^d	7,58 \pm 0,45 ^d	68,34 \pm 2,72 ^d	4,37 \pm 0,73	47,67 \pm 0,51 ^a	81,73 \pm 0,26
4	-	-	-	5,32 \pm 0,68	47,24 \pm 0,30 ^a	78,32 \pm 0,63 ^{a,b}
6	-	-	-	9,54 \pm 1,26 ^{b,c}	44,41 \pm 0,72 ^{a,b,c}	78,27 \pm 0,18 ^{a,b}

Diferenças estatisticamente significativas ^a em relação ao dia 0; ^b em relação ao dia 2; ^c em relação ao dia 4 ($p \leq 0,05$, ANOVA). ^d Diferenças estatisticamente significativas para a pata-roxa em relação ao hambúrguer para o mesmo tempo ($p \leq 0,05$, *t-student*).

Através do uso do simulador *online EasyRGB* (IRO, 2014), foi possível converter os valores médios de L^* , a^* e b^* nas respetivas cores (Figura 21) para facilitar a visualização da variação da cor das amostras ao longo do estudo.

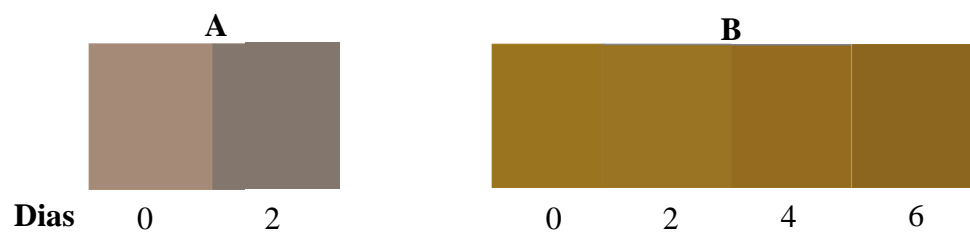


Figura 21 - Variação da cor de A) pata-roxa e de B) hambúrguer de pata-roxa quando embalados a vácuo e armazenados em refrigeração durante 2 e 6 dias, respectivamente.

Discussão

4.1. Capacidade antioxidante e efeito citotóxico e antiproliferativo nas células MCF-7

De um modo geral, verificou-se que os resultados obtidos mostraram uma clara vantagem em confeccionar hambúrgueres de pata-roxa, na medida em que foi detetado potencial antioxidante neste produto alimentar à base de pescado subvalorizado. Este potencial deve-se essencialmente aos ingredientes adicionados.

Nos ensaios de DPPH, os extratos produzidos a partir da matéria-prima apenas mostraram uma capacidade de 21,00% a 32,60% para reduzir o radical livre. O hambúrguer de pata-roxa revelou possuir uma capacidade de redução entre 73,58% a 79,48% para a mesma concentração de extrato. Uma vez que já tinha sido comprovado a capacidade de redução do radical livre DPPH da cebola e do alho em 79,00% e em 62,00%, respetivamente (Nuutila *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011), é expectável que a adição da cebola e do alho contribuíssem para o aumento do potencial antiradical demonstrado pelo hambúrguer em relação à matéria-prima. Os valores de EC₅₀ determinados para os extratos dos hambúrgueres (obtidos após 12h de extração) mostraram que o extrato metanólico teve maior efeito em reduzir o radical DPPH, contudo a variação da duração do processo de extração não foi significativamente vantajosa (de 366,80µg/mL a 12h para 354,60µg/mL a 24h de extração). Tendo em conta que o valor de EC₅₀ determinado para o tomate foi de 550µg/mL (Pinela *et al.*, 2012) e para o açafraão foi de 9740µg/mL (Cousins *et al.*, 2007), os resultados obtidos revelaram que a suplementação do hambúrguer de pata-roxa com os vários ingredientes permitiu incorporar compostos fitoquímicos cujo efeito sinérgico pode ter contribuído para o aumento do potencial antiradical do hambúrguer produzido.

Já foi comprovado em estudos anteriores que os ingredientes adicionados ao hambúrguer de pata-roxa possuem valores elevados de QTP e ORAC, como mostram as Tabelas 6 e 7, respetivamente. Contudo, os valores destas tabelas foram influenciados pelo tipo e duração do processo de extração, pelos solventes escolhidos, por adaptações ao método de deteção e por fatores como a origem, a espécie, quantidade utilizada, estado de maturação, o estado de conservação (frescas ou desidratadas) e às próprias condições de produção (estação do ano, temperatura, condições de solo) dos vários alimentos.

Relativamente aos resultados obtidos na QTP, era esperado um potencial antioxidante, ao nível dos valores de QTP obtidos para o hambúrguer, substancialmente superior, quer pelos ingredientes presentes individualmente, quer pelo possível efeito sinérgico entre estes. O maior valor de QTP obtido foi de 34,68mg EAG/100g de hambúrguer (metanol e

diclorometano, 24h) e, teoricamente, bastam 3g de açafraão-das-Índias para se obter o dobro do conteúdo fenólico (Wu *et al.*, 2004). É necessário ter em conta que (i) os valores da Tabela 6 provieram de diferentes métodos de extração, o que influencia a quantidade de polifenóis extraída, sugerindo, por sua vez, que o método de extração utilizado neste trabalho pode não ter sido eficiente na extração dos compostos fenólicos; (ii) os vários ingredientes foram analisados em conjunto e não individualmente, como nos estudos referenciados na Tabela 6, e desconhece-se o efeito sinérgico dos diferentes ingredientes sobre o conteúdo fenólico total do hambúrguer; e (iii) o hambúrguer também possui um teor lipídico (adquirido principalmente pelo óleo de linhaça) que poderá ter contribuído para uma ineficiente extração e/ou deteção dos compostos fenólicos.

Huang *et al.* (2005) comprovaram que o método de FC não é eficiente na deteção de polifenóis quando estão presentes, no extrato a analisar, compostos insolúveis em água, tornando-se ineficiente para fazer a quantificação total de polifenóis. Sabe-se que a curcumina (Prasad *et al.*, 2014), a piperina, (Wattanathorn *et al.*, 2008) e o canferol (Calderón-Montaña *et al.*, 2011) são exemplos de compostos que são insolúveis em água, e a probabilidade de estarem presentes no hambúrguer é alta, pelo que é possível que existam compostos nos extratos que interferiram com a metodologia de FC. Berker *et al.* (2013), por exemplo, propuseram usar isobutanol em vez de água destilada para permitir a deteção dos compostos insolúveis em água.

Relativamente ao processo de extração, não existe um processo universal adequado para todo o tipo de amostras (Boulekbach-Makhlouf *et al.*, 2013). A extração líquido-sólido por solventes é um processo simples e de fácil execução. No entanto, tem as desvantagens de ser demorado, de se usarem quantidades consideráveis de solventes orgânicos (que são tóxicos para o ambiente), e de ser pouco eficiente (Gil-Chávez *et al.*, 2013). A extração por micro-ondas tem vindo a revelar-se ser um método rápido e eficiente na extração de compostos fitoquímicos (Zill-e-Huma *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2012; Chemat e Cravotto, 2013; Setyaningsih *et al.*, 2015). Em relação à extração de polifenóis, Pan *et al.* (2003) mostraram que a aplicação deste tipo de processo com etanol a 30% durante 4 minutos permitiu extrair polifenóis em maior quantidade do que a extração tradicional à temperatura ambiente durante 20h. A extração por micro-ondas permite reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizado, pelo que também se torna uma alternativa mais rápida, económica e ecológica ao método de extração utilizado no presente trabalho.

Tabela 6 - Valores QTP (mínimos e máximos) de referência para cada ingrediente utilizado para a confecção de 100g de hambúrguer de pata-roxa.

Ingredientes	QTP (mg EAG/100g ingrediente)		Ingredientes (x gramas)	QTP (mg EAG/x gramas)	
	Min.	Máx.		Min.	Máx.
Cebola	23,00 ^a	164,00 ^b	Cebola (20,17g)	4,64	33,08
Alho	1,90 ^c	115,00 ^d	Alho (3,00g)	0,06	0,35
Açafrão-das-Índias	2117,00 ^e	2754,00 ^a	Açafrão-das-Índias (3,04g)	64,36	83,72
Pimenta preta	0,30 ^f	2250,00 ^a	Pimenta preta (0,80g)	0,002	18,00
Polpa de Tomate	30,00 ^g	360,56 ^h	Polpa de Tomate (15,77g)	4,73	56,86
Óleo de Linhaça	136,93 ⁱ	-	Óleo de Linhaça (4,96g)	6,79	-

^a Haytowitz e Bhagwat, 2010; ^b Lu *et al.*, 2011; ^c Gorinstein *et al.*, 2008; ^d Nuutila, 2003; ^e Wu *et al.*, 2004; ^f Shan *et al.*, 2007; ^g Apak *et al.*, 2007; ^h Patras *et al.*, 2009; ⁱ Teh e Birch, 2013.

No que diz respeito ao método do ORAC, os resultados revelaram que os extratos de metanol e metanol aquoso do hambúrguer possuíram um maior efeito antirradical sobre os radicais ROO[•] (que permitem o avanço da peroxidação lipídica). Obtiveram-se 8603,01µmol ET/100g e 9274,58µmol ET/100g após 12h de extração, e 8597,80µmol ET/100g e 10009,50µmol ET/100g após 24h de extração para os extratos metanólico e metanólico aquoso, respetivamente. Estes resultados ultrapassaram as perspetivas, tendo em conta os valores reunidos da Tabela 7. Teoricamente, se 100g de cebola proporcionam 751 a 1457µmol ET/100g (Haytowitz e Bhagwat, 2010), seriam necessários 687g a 1333g de cebola para obter o mesmo potencial antioxidante máximo detetado para 100g de hambúrguer de pata-roxa. Resumindo, reafirmou-se que o hambúrguer tem poder antioxidante com potencial para retardar a peroxidação lipídica.

Relativamente ao resultado de ORAC do extrato de metanol com diclorometano (1766,02µmol ET/100g), este foi inferior aos outros extratos, embora tenha sido, ainda assim, superior à matéria-prima tratada nas mesmas condições. Isto sugere que o diclorometano afetou a extração de compostos com ação antirradical mais direcionada para os radicais ROO[•], uma vez que a capacidade de redução do radical DPPH não variou em relação aos outros extratos.

Tabela 7 - Valores ORAC (mínimos e máximos) de referência para cada ingrediente utilizado para a confecção de 100g de hambúrguer de pata-roxa.

Ingredientes	ORAC ($\mu\text{mol ET}/100\text{g ingrediente}$)		Ingredientes (x gramas)	ORAC ($\mu\text{mol ET}/x \text{ gramas}$)	
	Min.	Máx.		Min.	Máx.
Cebola	751,00 ^a	1457,00 ^a	Cebola (20,17g)	151,48	293,88
Alho	6665,00 ^a	15430,00 ^d	Alho (3,00g)	199,95	462,90
Açafrão-das-Índias	109400,00 ^a	183200,00 ^a	Açafrão-das-Índias (3,04g)	3325,76	5569,28
Pimenta preta	4600,00 ^b	42400,00 ^a	Pimenta preta (0,80g)	36,80	339,20
Polpa de Tomate	420,00 ^c	694,00 ^a	Polpa de Tomate (15,77g)	66,23	109,44

^a Haytowitz e Bhagwat, 2010; ^b Shan *et al.*, 2007; ^c Apak *et al.*, 2007; ^d Iliev *et al.*, 2013

O potencial anticancerígeno dos alimentos usados para suplementar o hambúrguer de pata-roxa já foi determinado em estudos anteriores (Robert *et al.*, 2001; Kris-Etherson *et al.*, 2002; Kaefer, 2008; Lin e Lin, 2008; Ravindram *et al.*, 2009; Palozza *et al.*, 2011; Bhagwat *et al.*, 2013) e, tendo conhecimento sobre o crescente número de novos casos de cancro por todo o mundo, foi avaliado o potencial do hambúrguer de pata-roxa para afetar a viabilidade celular da linha celular MCF-7. Contudo, os ensaios que foram realizados apenas permitem avaliar potenciais efeitos citotóxico ou antiproliferativo no modelo celular do cancro da mama para concentrações muito elevadas de extrato; não permitem validar características anticancerígenas do hambúrguer num organismo humano.

Os resultados obtidos mostraram que (i) os extratos de pata-roxa não possuem citotoxicidade e que (ii) os extratos de metanol aquoso e metanol com diclorometano tiveram um pequeno efeito antiproliferativo sobre as células MCF-7 à concentração de 1mg/mL. Este último resultado é interessante, pois adiciona potencial anticancerígeno ao hambúrguer de pata-roxa. Por sua vez, os extratos de hambúrguer de pata-roxa só revelaram algum efeito na viabilidade celular à concentração de 1mg/mL. A baixa viabilidade celular detetada nos ensaios de proliferação celular indica que, a esta concentração, os diferentes extratos são essencialmente citotóxicos.

Estes resultados não significam que os extratos de hambúrguer de pata-roxa não contêm compostos fitoquímicos com capacidade antiproliferativa. Já foi comprovado que a pimenta-preta (Lai *et al.*, 2012), a cebola e o alho (Boivin *et al.*, 2009) têm potencial antiproliferativo para com células do cancro da mama. Mais especificamente, a curcumina (do açafrão), a apigenina (da cebola), o dissulfureto de dialilo (do alho e da cebola) e a quercetina (do alho,

da cebola, do açafrão e do tomate) já demonstraram o seu potencial antiproliferativo sobre diferentes tipos de células cancerígenas (Davis *et al.*, 2010).

Como já foi comprovado que a combinação de diferentes compostos fitoquímicos potencia os seus efeitos anticancerígenos (Araújo *et al.*, 2011), é possível que, neste caso, o conjunto de compostos extraídos tenha potenciado a atividade citotóxica sobre as células MCF-7. Um dos mecanismos que é fortemente afetado pela presença da curcumina (Al-Hujaily *et al.*, 2011) e da quercetina (Sun *et al.*, 2010) é o sistema *Nuclear Factors-kappaB* (NF-κB) que, ao ser inibido ou bloqueado, pode não só interromper a proliferação celular, como pode tornar as células cancerígenas mais sensíveis ao efeito citotóxico de outros compostos (Karin, 2006).

O sistema NF-κB consiste num conjunto de fatores de transcrição nucleares que desempenham um papel fundamental da regulação das respostas imunitárias e inflamatórias, da apoptose e da oncogénese (Karin e Lin, 2002). Encontram-se ligados a inibidores no citoplasma, uma vez que sua ativação aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos (Karin, 2006). O crescimento tumoral induzido por inflamação mediado pelo desregulamento do fator de necrose tumoral alfa (tumour-necrosis factor- α – TNF α) (Sethi *et al.*, 2009) pode despoletar o desbloqueio do sistema NF-κB, tornando-o num dos principais mecanismos para a fase de iniciação de um tumor, pois impedirá que a apoptose seja induzida (Karin, 2006). O que justifica porque o sistema NF-κB é alvo de agentes anticancerígenos (Kuno *et al.*, 2012). A curcumina, ao inibir o sistema NF-κB, consegue, ainda que indiretamente, ativar a troca entre o crescimento tumoral induzido por inflamação mediado por TNF α para a regressão tumoral mediado por outro fator de necrose tumoral (Luo *et al.*, 2004) que induz a apoptose através da ligação a recetores de morte (Ravi *et al.*, 2001). A apoptose trata-se de um processo de morte celular programada que é iniciado quando as células estão danificadas, anormais ou em excesso (Davis *et al.*, 2010). A indução deste processo através da via mitocondrial pode ser acionada pela apigenina (cebola), quercetina (alho, cebola, açafrão, tomate), β -caroteno (linhaça), dissulfureto de dialilo (alho e cebola) e também pela curcumina (açafrão), entre vários outros (Davis *et al.*, 2010). Estes compostos possuem alguns mecanismos em comum ou com o mesmo objetivo. Está incluída a provocação na diferença de carga entre a mitocôndria e o citoplasma (potencial da membrana mitocondrial) (curcumina, β -caroteno, e o dissulfureto de dialilo) (Davis *et al.*, 2010), que leva ao aumento de poros na membrana mitocondrial e à libertação e aumento do citocromo c (e outros fatores apoptóticos mitocondriais) (Ly *et al.*, 2003) no citoplasma (apigenina, β -caroteno e o dissulfureto de

dialilo), bem como ao aumento das caspase-3 e caspase-9 (apigenina, β -caroteno e o dissulfureto de dialilo), que são proteases do processo apoptótico (Igney e Krammer, 2002).

Contudo, o efeito da ação dos compostos fitoquímicos pode ficar comprometido devido à aplicação de tratamentos térmicos para prolongar o período de vida útil de prateleira de produtos alimentares. Como são compostos sensíveis ao calor, a prática é considerada como um processo que desvaloriza as propriedades nutricionais (Choi *et al.*, 2005). No entanto, o potencial antiradical e o conteúdo fenólico de alguns vegetais, em alguns casos, têm-se mantido relevantes após um tratamento térmico (Choi *et al.*, 2005; Abreu e Barcelos, 2012; Dini *et al.*, 2013). Os resultados sugerem que o hambúrguer de pata-roxa cozinhado (20 minutos a 180°C) é um desses casos, pois o potencial antiradical contra o radical DPPH é significativamente maior e a QTP não apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação ao extrato do hambúrguer cru.

Esperava-se que o tratamento térmico degradasse compostos nutricionais e, indiretamente, diminuísse o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa (Wangcharoen e Morasuk, 2009). Os resultados do ensaio ORAC comprovaram a diminuição no potencial antiradical, no entanto, os ensaios de DPPH, mostraram que (i) a perda do potencial antiradical situou-se essencialmente na capacidade de interagir com os radicais ROO^{*}; e que (ii) o hambúrguer possui um potencial antioxidante relevante após o tratamento térmico. Em relação aos efeitos citotóxico e antiproliferativo, verificou-se o mesmo comportamento: não há efeito a baixas concentrações e, a uma concentração de 1mg/mL, os extratos são essencialmente citotóxicos na linha celular MCF-7. O tratamento térmico, embora afete a capacidade antioxidante, não alterou o efeito citotóxico para elevadas concentrações de extrato no modelo celular do cancro da mama utilizado.

Abreu e Barcelos (2012) demonstraram que, no caso do tomate, os teores de licopeno, de β -caroteno e de polifenóis aumentaram com a subida da temperatura. Trata-se de um exemplo que permite justificar as observações acima referidas em relação ao potencial antioxidante e citotóxico do hambúrguer de pata-roxa, quando era esperado resultados inversos devido à sensibilidade térmica dos compostos fitoquímicos (Réblová, 2012). Os resultados exigem um estudo mais pormenorizado sobre o efeito do tratamento térmico sobre o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa através da variação da temperatura, da duração do processo e da aplicação de diferentes métodos de cozedura, para avaliar a perda do potencial antioxidante específica para radicais ROO^{*}.

Curiosamente, foi observada uma discrepância nos valores de ORAC dos extratos metanólicos entre as amostras cruas usadas para o estudo do potencial antioxidante e as

amostras cruas usadas como controlo no estudo do efeito do tratamento térmico. Estas amostras pertenciam ao mesmo lote, foram armazenadas a -80°C , mas foram usadas com 45 dias de diferença. Apesar de analisadas nas mesmas condições (estado cru, metanol, 12h de extração), ocorreu uma perda de 54,72% no potencial antiradical para com radicais ROO^{\bullet} . Por outro lado, os respetivos valores de DPPH mostram que a atividade antiradical manteve-se estável, apresentando valores de EC_{50} similares entre as amostras cruas frescas e as amostras cruas após 45 dias. Estes resultados sugerem que houve uma perda de atividade antiradical específica, pelo menos, para o tipo de radicais livres gerados no ensaio ORAC à semelhança do que foi observado nas amostras que sofreram tratamento térmico.

Patthamakanokporn *et al.* (2008) mostraram que o potencial antioxidante varia de alimento para alimento, no mesmo período de tempo em armazenamento. Mas há poucos estudos sobre o efeito do armazenamento a baixas temperaturas sobre o potencial antioxidante de um produto alimentar para ser possível prever qual poderá ser o efeito do armazenamento sobre o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa. Como tal, é aconselhada a realização de um estudo que permita determinar se o hambúrguer perde efetivamente algum potencial antioxidante (como sugerem os resultados obtidos) devido à temperatura baixa de armazenamento e o que pode ser feito para o prevenir. A determinação em simultâneo do índice de TBA pode testar a hipótese de ter sido a ação antiradical que reduziu o potencial no hambúrguer de pata-roxa ao impedir o avanço da peroxidação lipídica, porque (i) as amostras não foram privadas de oxigénio durante o armazenamento a -80°C e (ii) a atividade antiradical detetada no ensaio de DPPH continuou elevada, o que sugere que o hambúrguer ainda tem um potencial antioxidante significativo apesar da perda específica observada.

4.2. Estabilidade após embalamento a vácuo

A qualidade de um produto alimentar é um conceito complexo que envolve vários fatores para o consumidor, nomeadamente, segurança, nutrição, disponibilidade, conveniência, frescura e características físicas. Em particular para pescado e derivados de pescado, a frescura é um parâmetro essencial que depende de vários fatores biológicos, bioquímicos e físicos, como alterações na carga microbiana, o aumento da peroxidação lipídica e as alterações na cor do produto alimentar (Olafsdottir *et al.*, 2004).

O tipo de embalamento tem um forte impacto sobre a qualidade de um alimento. O embalamento a vácuo prolonga o tempo de vida útil ao limitar a disponibilidade de O_2 necessária para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios (Genç *et al.*, 2013). Contudo,

o produto alimentar continua suscetível ao crescimento microbiano aeróbio facultativo e estritamente anaeróbio.

As contagens de microrganismos viáveis “totais” e degradativos em ambientes de aerobiose e anaerobiose realizadas no presente trabalho permitiram constatar: (i) que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as contagens dos microrganismos aeróbios dos anaeróbios, quer na pata-roxa, quer no hambúrguer, sugerindo que os microrganismos presentes nestas amostras são facultativos, pois conseguem sobreviver em ambientes com e sem oxigênio; (ii) que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as contagens dos microrganismos “totais” e degradativos na pata-roxa, o que sugere que estão presentes maioritariamente microrganismos degradativos no pescado; (iii) e que as diferenças estatisticamente significativas entre as contagens dos microrganismos “totais” e degradativos no hambúrguer sugerem uma cultura microbiota mais diversificada.

No caso da pata-roxa, as observações anteriores apontam para que a maioria dos microrganismos presentes inicialmente na matéria-prima poderá ser *Shewanella putrefaciens*, um organismo anaeróbico facultativo e produtor de H₂S frequentemente responsável pela degradação de pescado conservado em gelo ou em refrigeração (Moser e Nealson, 1996; Gram e Dalgaard, 2002; Remenant *et al.*, 2014). Contudo, tendo em conta a conservação posterior em vácuo, é natural que outros microrganismos sejam favorecidos pelas condições anaeróbias. É o caso das enterobactérias, das bactérias lácticas ou do *Photobacterium*, que são microrganismos anaeróbios facultativos/estritos e igualmente produtores de H₂S (Gram e Dalgaard, 2002; Masniyom, 2011). As enterobactérias e as bactérias lácticas, sendo mesófilos, desenvolvem-se principalmente no pescado conservado com abuso de temperatura. A temperatura de conservação da pata-roxa e do hambúrguer apresentou, neste estudo, algumas flutuações, tendo-se registado um valor médio de 10,3°C [7,7°C; 14,3°C]. Como o hambúrguer é à base de pata-roxa, pode-se deduzir que estes produtores de H₂S também estejam presentes na população microbiana do hambúrguer. Contudo, ao contrário da matéria-prima, possui ainda uma população de microrganismos aeróbios facultativos significativa que não produzem H₂S.

Como a temperatura de armazenamento observada na câmara frigorífica foi sempre demasiado alta para uma refrigeração alimentar adequada, um armazenamento a 5°C terá consequências positivas sobre o período de vida útil do hambúrguer de pata-roxa.

Para controlar o desenvolvimento de *S. putrefaciens*, de enterobactérias e de microrganismos estritamente anaeróbios, como o *Photobacterium phosphoreum*, frequentemente responsável pela degradação de pescado armazenado em vácuo e em

ambientes ricos em CO₂ (Remenant *et al.*, 2014), é necessário recorrer a um tipo de embalagem diferente. O embalagem com atmosfera modificada é uma alternativa (Velu *et al.*, 2013), usando-se ratios de azoto (N₂), O₂ e CO₂ diferentes do ar comum (78% N₂, 21% O₂ e 0,04% CO₂) (Gorris e Peppelenbos, 1992). Já foi aplicada anteriormente a pescado, nomeadamente à sardinha fresca, usando 60% CO₂ e 40% N₂ (Özogul *et al.* 2004) e ao salmão com 80% CO₂, 5% O₂ e 15% N₂ (Pastoriza e Bernárdez, 2011). Em ambos os casos, o pescado fresco manteve a qualidade durante 12 dias. Para que uma atmosfera rica em dióxido de carbono não favoreça exclusivamente microrganismos anaeróbios como *Photobacterium phosphoreum*, um nível mínimo de 1 a 2% de oxigénio deve ser introduzido na embalagem (Gorris e Peppelenbos, 1992).

Para além de especular sobre o tipo de microrganismos presentes no pescado subvalorizado usado e no hambúrguer de pata-roxa, os resultados das contagens de microrganismos viáveis “totais” e degradativos permitiram também analisar o comportamento do crescimento microbiano ao longo do estudo.

O presente trabalho mostrou que, ao ser embalado a vácuo, foi possível manter a pata-roxa abaixo do critério microbiológico de 10⁷ ufc/g durante 2 dias, o que confirma a estimativa apresentada por Huss (1995). No entanto, a carga microbiana inicial do pescado já se encontrava acima de 10⁶ ufc/g para as contagens “totais” de aeróbios. Estes resultados permitem especular que o tempo de preparação do lote 3 (≈6h à temperatura ambiente) pode ter sido um fator determinante para um grande desenvolvimento microbiano no produto alimentar logo após a sua preparação.

Para o hambúrguer, os resultados revelaram: (i) que as contagens “totais” iniciais não foram tão elevadas como se constatou para a matéria-prima e que (ii) o desenvolvimento microbiano aeróbio e anaeróbio foi mais lento, mantendo-se abaixo do critério microbiológico durante 6 dias. Ambas observações estão interligadas com o facto das quantidades de pescado utilizadas no controlo (51g) e no hambúrguer (25g) terem sido diferentes (para que a massa final fosse igual), o que terá influenciado a carga microbiana inicial do hambúrguer. No entanto, vários estudos já comprovaram que as especiarias e os vegetais permitem prolongar o tempo de vida útil de prateleira de produtos alimentares devido à capacidade de compostos fitoquímicos para afetar o desenvolvimento bacteriano (Prasad e Seenayya, 2000; Du *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Radha krishnan *et al.*, 2013). Em particular, o alho (Babu *et al.*, 2011) o açafraão-das-Índias (Wang *et al.*, 2009) e a pimenta preta (Zarai *et al.*, 2013) são ingredientes com grande poder antibacteriano no hambúrguer de pata-roxa. É, por isso,

possível que tenham exercido esse efeito sobre o desenvolvimento bacteriano do hambúrguer, tornando-o mais lento.

Em relação aos esporos de *Clostridium* sulfito-redutores, a presença foi negativa para 1g de pata-roxa e positiva para 1g de hambúrguer de pata-roxa. Estes resultados levam a considerar o uso do calor para reduzir a presença destes microrganismos no hambúrguer. Glass e Marshall (2013) aconselham um pré-tratamento térmico antes do embalamento e armazenamento de um alimento para reduzir o desenvolvimento microbiano patogénico. O tratamento térmico a 90°C durante 10 minutos (no mínimo) é necessário para reduzir até 10⁶ufc *C. botulinum*/g (ECFF, 2006), ao passo que bastam 90 segundos a 65°C para eliminar 90% da carga inicial de *C. perfringens* (Byrne *et al.*, 2006). Como se trata de um indicador de contaminações persistentes e também um indicador da presença de patogénicos *Clostridium*, a pesquisa de esporos deve ser realizada no hambúrguer de pata-roxa sempre que o produto não for tratado termicamente.

Em relação ao desenvolvimento das enterobactérias, ambas as amostras apresentaram um nível inicial acima de 10⁴ ufc/g. Mais uma vez, o tempo de preparação dos hambúrgueres foi um fator determinante para os resultados obtidos e o abuso de temperatura favorece o crescimento das enterobactérias (Huss, 1995).

Ao contrário do que se observou para as contagens de aeróbios e anaeróbios, as contagens iniciais de enterobactérias em ambas as amostras não apresentaram diferenças. Logo, não é possível que a origem de contaminação deste tipo de microrganismos no hambúrguer fosse somente a matéria-prima. Na verdade, embora algumas estirpes de enterobactérias sejam específicas no ambiente trato intestinal, outras, como *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, são comumente encontradas no solo, em água e nas plantas (Baylis *et al.*, 2011). A sua dispersão na natureza pode implicar que os utensílios de manuseamento para a confeção dos hambúrgueres estivessem minimamente contaminados com enterobactérias. Apesar das contagens iniciais elevadas, observou-se que não houve mais desenvolvimento microbiano na matéria-prima nos primeiros dois dias e, para o hambúrguer, só aumentou a partir do 4º dia de armazenamento em refrigeração. Mais uma vez, é possível que os ingredientes adicionados tenham exercido o seu efeito antibacteriano e retardado o desenvolvimento destas bactérias.

Por norma, um grande desenvolvimento de enterobactérias – como o verificado no presente trabalho – pressupõe que haja também a possibilidade de contaminantes patogénicos no alimento (Baylis *et al.*, 2011). Contudo, os resultados foram (i) 1,0x10¹ufc de *E.coli* por 1g de pata-roxa e 1g de hambúrguer e (ii) ausência de *Salmonella* em 25g de pata-roxa e em 25g

de hambúrguer. Assim, verifica-se que não houve contaminações fecais na matéria-prima ou no hambúrguer, na medida em que foi detetado um nível de *E.coli* muito abaixo do limite máximo permitido em alimentos (500ufc/g). Alguns estudos comprovam a ação antibacteriana da pimenta preta (Zarai *et al.*, 2013) e do açafrão-das-Índias (Wang *et al.*, 2009; Bajpai *et al.*, 2012) sobre a *E.coli* e estirpes de *Salmonella*. Por outro lado, a pata-roxa não contém nenhuma especiaria adicionada e também aqui se observou a ausência destes patogénicos. Pode-se deduzir que a matéria-prima não entrou em contacto com qualquer fonte de contágio de *Salmonella* durante o seu processamento. No entanto, os resultados obtidos não invalidam a presença de outras enterobactérias patogénicas (Huss, 1993) e como existe uma contaminação geral de enterobactérias em água, solo e alimentos (Baylis *et al.*, 2011), realizar pesquisas para outros patogénicos pode ser uma medida fundamental para assegurar a segurança alimentar do hambúrguer de pata-roxa. Hipóteses a ter em consideração são a *Shigella* (contaminação fecal), *Yersinia* (contaminação por solo ou água) e *Serratia marcescens* (contaminação por solo ou água) (Baylis *et al.*, 2011).

A ausência de oxigénio não afeta somente o desenvolvimento microbiano num alimento embalado a vácuo; afeta igualmente o avanço da peroxidação lipídica do produto alimentar (Masniyom, 2011). Tendo em conta a natureza das amostras, a diferença dos índices iniciais de TBA entre ambas foi a esperada. O baixo valor do pescado está em concordância com o facto de a pata-roxa ser um peixe de baixo teor lipídico (2,7% de lípidos) (García-Moreno *et al.*, 2013). O hambúrguer acusou um índice de TBA superior em relação ao pescado, o que concorda com o facto de possuir óleo de linhaça na sua composição. É um ingrediente com cerca de 30% de ácidos gordos saturados e 70% de ácidos gordos insaturados, possuindo cerca de 50mg ácido α -linoleico (ómega-3) por cada 100g de óleo de linhaça (Mozaffarian e Wu, 2011). O elevado teor de lípidos insaturados torna o óleo de linhaça mais suscetível a sofrer peroxidação lipídica, quando entra em contacto com o oxigénio. Embora fosse esperado que o índice de TBA do hambúrguer de pata-roxa fosse superior ao da matéria-prima, há também a possibilidade dos valores obtidos serem maiores do que o esperado: o tempo de confeção do lote de hambúrgueres foi longo, o que pode ter contribuído para acelerar a peroxidação lipídica; ou, não sendo específica a reação entre o reagente TBA e o composto MDA (Schmidt, 1959), existe a probabilidade que outros compostos tenham reagido com o TBA, induzindo a um índice de TBA maior do que devia ter sido.

O comportamento da peroxidação lipídica ao longo do tempo para as duas amostras também vai de encontro ao esperado. O oxigénio tem um papel fundamental na fase de propagação do processo, induzindo a uma contínua oxidação de ácidos gordos polinsaturados.

Como a peroxidação lipídica origina alterações desagradáveis a nível do sabor, do odor e da cor, a privação do O₂ provou ser uma medida importante para retardar a perda da qualidade do produto alimentar. O hambúrguer de pata-roxa possui ainda a vantagem de possuir potencial antiradical relevante e suficiente para, teoricamente, ser capaz de retardar a ação dos radicais ROO• sobre os ácidos gordos polinsaturados. No entanto, o estudo não foi longo o suficiente para se poder concluir sobre o efeito antioxidante dos ingredientes sobre o período de vida útil de prateleira dos hambúrgueres.

O índice de TBA não permite concluir sobre a qualidade do produto, uma vez que é um valor meramente indicativo e não se encontra legislado. No entanto, se se possuir um perfil de peroxidação lipídica ao longo do tempo para o hambúrguer de pata-roxa, este parâmetro pode tornar-se num avaliador de segurança alimentar.

A cor é um parâmetro de qualidade que se altera consoante a ação microbiana e a ação oxidativa que ocorrem no produto alimentar (Ghaly *et al.*, 2010). Os resultados obtidos sugerem que, em termos visuais, a qualidade da pata-roxa diminui mais depressa em comparação com o hambúrguer, nos primeiros dois dias de refrigeração. Dado que, para o mesmo período de tempo, não houve alterações estatisticamente significativas no índice de TBA no pescado, mas houve, desde o dia 0, uma elevada carga microbiana, é possível deduzir que as alterações a nível da cor devem-se principalmente à ação microbiana na pata-roxa. No caso do hambúrguer, a mesma dedução mantém-se (o índice de TBA também não variou), mas tal como se observou um desenvolvimento bacteriano mais lento, a cor também variou mais lentamente, não variando significativamente até ao 4º dia.

Ao contrário do índice de TBA, a variação da cor permite concluir sobre a qualidade alimentar. No ato da compra, é um parâmetro decisivo para a aceitabilidade do produto; só depois é que são usados outros sentidos, como o olfato e o paladar, na avaliação da qualidade do produto (Wu e Sun, 2013). Assim, como o hambúrguer demonstrou estabilidade na cor até ao 4º dia de refrigeração, poder-se-ia supor que a sua qualidade seria aceitável. Mas os resultados obtidos mostraram que, ao 4º dia em refrigeração, a carga microbiana era elevada, pelo que a análise da cor, neste caso específico, é insuficiente para avaliar a qualidade do hambúrguer de pata-roxa.

Conclusão

O desenvolvimento do hambúrguer de pata-roxa teve a finalidade de reaproveitar pescado subvalorizado e proporcionar uma fonte nutricional rica em antioxidantes pela adição de ingredientes com elevada capacidade antioxidante. Deste modo, procedeu-se à avaliação do potencial antioxidante e da estabilidade em refrigeração do hambúrguer de pata-roxa embalado a vácuo.

De acordo com os resultados obtidos, a suplementação do hambúrguer de pata-roxa com ingredientes comumente usados no dia-a-dia permitiu que se evidenciasse uma elevada capacidade antioxidante através dos métodos de DPPH e ORAC. Por outro lado, os extratos dos hambúrgueres revelaram citotoxicidade apenas para as concentrações extremamente elevadas e ausência de capacidade antiproliferativa. Ensaio preliminares sugerem que o hambúrguer consegue manter características antioxidantes após o tratamento térmico (20 minutos a 180°C). Por sua vez, o embalamento a vácuo e a temperatura de conservação, permitiram que o hambúrguer se mantivesse abaixo do critério microbiológico para microrganismos aeróbios (10^7 ufc/g) durante os primeiros 6 dias de armazenamento. Foram detetados esporos de *Clostridium* sulfito-redutores e $1,0 \times 10^1$ ufc *E. coli* por 1g de hambúrguer, e não foi detetada *Salmonella* spp. no hambúrguer de pata-roxa. A diferença de cor e a peroxidação lipídica do hambúrguer mantiveram-se estáveis durante 4 e 6 dias, respetivamente. Claramente, o hambúrguer de pata-roxa apresentou uma maior estabilidade durante o armazenamento em vácuo em termos microbiológicos e evolução da cor.

Contudo, é necessário continuar o estudo a fim de compreender o efeito do armazenamento e tratamento térmico sobre as qualidades nutricionais e a aceitabilidade do consumidor. Do presente trabalho conclui-se que o hambúrguer de pata-roxa reúne as condições para apresentar um elevado potencial antioxidante e, em simultâneo, poder constituir uma solução para o desperdício de pescado.

Perspetivas futuras

O processo de desenvolvimento de um novo produto funcional com sucesso é composto por diversas etapas (IFT, 2004). Relativamente às etapas correspondentes ao estudo do novo alimento funcional, a identificação da relação entre os componentes do produto alimentar e benefícios na saúde (prevenção contra a peroxidação lipídica), e o veículo de transporte dos compostos fitoquímicos com capacidades antioxidante e anticancerígena (hambúrguer de pata-roxa) foram etapas desenvolvidas por Marinho e Norte (2012). O presente trabalho desenvolveu a etapa da demonstração do efeito pretendido (elevado potencial antioxidante) e da observação da estabilidade do hambúrguer de pata-roxa embalado em vácuo. No entanto, é ainda necessário:

- Estudar o efeito da congelação sobre o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa cru embalado a vácuo;
- Acompanhar a estabilidade ao longo do armazenamento em congelação a fim de prever o período de vida útil de prateleira, já que a congelação constitui uma forma de armazenamento mais interessante para a indústria na medida em que permite a exportação para países longínquos;
- Afinar a receita do hambúrguer de pata-roxa;
- Realizar análises sensoriais ao hambúrguer de pata-roxa fresco e ao processado para prever a aceitabilidade do consumidor final;
- Estudar o efeito do pré-tratamento térmico sobre o período de vida útil de prateleira do hambúrguer de pata-roxa conservado em refrigeração;
- Estudar o efeito do embalamento com atmosfera modificada sobre o período de vida útil de prateleira do hambúrguer de pata-roxa conservado em refrigeração;
- Estudar o efeito de diferentes tratamentos térmicos sobre o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa para averiguar qual o tratamento térmico que salvguarde (ao máximo) o potencial antioxidante e, em simultâneo, permita a segurança alimentar do hambúrguer de pata-roxa.

A etapa da demonstração da segurança do novo produto alimentar pode ser complementada através de realização de ensaios em linhas celulares humanas normais com os extratos que demonstraram citotoxicidade na linha celular MCF-7. Posteriormente, e só após a confirmação da seletividade do efeito citotóxico em células cancerígenas, seria interessante testar os extratos de hambúrguer de pata-roxa em modelos animais para averiguar se o efeito citotóxico é relevante em organismos.

Algumas modificações e otimizações podem ser tidas em conta para melhorar a exatidão e precisão dos resultados obtidos para o caso do hambúrguer de pata-roxa. Já foi

proposto anteriormente (i) a adaptação do protocolo para a quantificação total de polifenóis às características do hambúrguer, (ii) modificar o processo de extração para melhorar a eficiência da extração dos compostos fitoquímicos, (iii) estabelecer condições para que a confeção do hambúrguer seja mais rápida e, conseqüentemente, limite a carga inicial microbiana e o início da degradação dos ingredientes, e (iv) incluir pesquisas de mais microrganismos patogénicos da família Enterobacteriaceae no estudo microbiológico.

Caprioli *et al.* (2011) sugerem que o método para determinar o índice de TBA deve ser adaptado e otimizado para produtos alimentares específicos na eventualidade de possuírem compostos que possam interferir nas leituras dos resultados. Também é aconselhado recorrer a diferentes geradores de radicais livres para realizar os ensaios ORAC, porque, embora o reagente AAPH possa ser usado para gerar oxidação em ácidos gordos dispersos em soluções aquosas, existem outros geradores mais apropriados para ambientes apolares (Yamamoto *et al.*, 1984; Noguchi *et al.*, 1998; Culbertson *et al.*, 2000).

O presente trabalho mostrou que o potencial antioxidante do hambúrguer de pata-roxa provinha essencialmente dos ingredientes usados para suplementar o hambúrguer. Este facto alerta à necessidade de conhecer melhor o potencial antioxidante dos próprios ingredientes. A compilação dos valores de QTP e ORAC revelaram a importância da origem e das condições de produção das amostras que estão a ser analisadas. Como tal, pode ser importante determinar o potencial antioxidante dos ingredientes do hambúrguer, inclusive de ingredientes de diferentes marcas ou origens. Irá ajudar não só a prever com maior exatidão o potencial antioxidante do hambúrguer, como também permitirá a seleção dos ingredientes que mais enriquecerão o produto final.

Pode ser igualmente interessante complementar o estudo microbiológico com ensaios de aplicação direta do extrato de hambúrguer (antes e/ou depois de um tratamento térmico) sobre culturas de microrganismos patogénicos ou não-patogénicos isolados para determinar o seu potencial antibacteriano. Poder-se-ia aplicar este tipo de ensaio em culturas de *Streptococcus bovis* e de *Helicobacter pylori*, uma vez que estão associados ao surgimento de cancro no cólon (Peek e Blaser., 2002; Gold *et al.*, 2004).

Bibliografia

- Ababouch, L. (2005a) [recurso eletrônico]. *Nutritional elements of fish*. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Roma: FAO. [Consult. 10/10/2014]. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/topic/12319/en>.
- Ababouch, L. (2005b) [recurso eletrônico]. *Reducing post-harvest losses*. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Roma: FAO. [Consult. 11/04/2014]. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/topic/12369/en>.
- Abbasi, M.A., Ilyas, M., Aziz-ur-Rehman, Sonia, A., Shahwar, D., Raza, M.A., Khan, K.M., Ashraf, M., Afzal, I., e Ambreen, N. (2012). Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. *Scientia Iranica*, 19(6):1580-1583.
- Abreu, W.C., e Barcelos, M.F.P. (2012). Antioxidant Activity of the Tomato Pulp Submitted to Domestic Thermal processing at different Times. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(2):71-77.
- ACS (American Cancer Society) (2010). [recurso eletrônico]. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society. [Consult. 02/02/2014]. Disponível em <http://www.cancer.org>.
- ACS (American Cancer Society) (2012). [recurso eletrônico]. *Cancer Facts & Figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society. [Consult. 02/02/2014]. Disponível em <http://www.cancer.org>.
- ACS (American Cancer Society) (2014). [recurso eletrônico]. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: American Cancer Society. [Consult. 22/09/2014]. Disponível em <http://www.cancer.org>.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B., Farooq, S., Ali, M., e M.A., K. (2012). Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3):1945-1953.
- Ak, T., e Gülçin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174:27-37.
- Alam, N., Bristi, N.J., e Rafiquzzaman (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21:143-152.
- Al-Hujaily, E.M., Mohamed, A.G., Al-Sharif, I., Youssef, K.M., Manogaran, P.S., Al-Otaibi, B., Al-Haza'a, A., Al-Jammaz, I., Al-Husseini, K., e Aboussekhra, A. (2011). PAC, a novel curcumin analogue, has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128:97-107.

- Almeida, G. (2002). *Indicações Gerais – Nota sobre as grandezas ângulo plano e ângulo sólido e correspondentes unidades SI*. In: *Sistema Internacional de Unidades (SI): Grandezas e Unidades Físicas – terminologias, símbolos e recomendações*. 3ª Edição. Portugal: Plátano Editora. ISBN: 972-707-162-7.
- An, G., Gallegos, J., e Morris, M.E. (2011). The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abc2-mediated quercetina efflux. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(3):426-432.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirate, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., e Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various total antioxidant capacity Assays applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12:1496-1547.
- Araújo, J.R., Gonçalves, P., e Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31:77-87.
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. 4ª Edição. Washington, D.C.: ASM Press. ISBN: 978-1-4398-0408-7.
- Babu, A.J., Sundari, A.R., Indumathi, J., Srujan, R.V.N., e Sravanthi, M. (2011). Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential oils of Spices. *Veterinary World*, 4(7):311-316.
- Bajpai, V.K., Baek, K., e Kang, S.C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food research International*, 45:722-734.
- Baross, J. (1992). *Halophilic and Osmophilic microorganisms*. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3ª Edição. E.U.A.: American Public Health Association. ISBN: 978-0-87553-022-2.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., e Davis, A. (2011). [recurso eletrônico]. *The Enterobacteriaceae and their Significance to the Food Industry*. 1ª Edição. Bélgica: ILSI Europe Report Series. [Consult. 05/09/2014]. Disponível em <http://www.ilsis.org/Europe/Pages/ViewItemDetails.aspx?WebID=84d7fa4a-0fd5-40cd-a49a-2da6fcd654&ListID=0348eb34-df85-49dd-9ade-77ed136643f1&ItemID=302>. ISBN 9789078637332.
- Becker, E.M., Nissen, L.R., e Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6):561-571.
- Béliveau, R. e Gingras, D. (2006). *Alimentos contra o cancro: A prevenção e o tratamento do cancro pela alimentação*. 1ª Edição portuguesa. Portugal: Guerra e Paz, Editores S.A.. ISBN: 989-8014-11-3.

- Bennett, L.L., Rojas, S., e Seefeldt, T. (2012). Role of antioxidants in the Prevention of Cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 4(4):215-222.
- Berker, K.I., Olgun, F.A., Ozyurt, D., Demirata, B., e Apak, R. (2013). Modified Folin-Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:4783-4791.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., e Holden, J. (2013). [recurso eletrônico]. *USDA Database for the Flavonoid Content of Select Foods - Release 3.1*. Maryland: U.S. Department of Agriculture. [Consult. 23/04/2014]. Disponível em <http://www.ars.usda.gov>.
- Bianchi, M.L., e Antunes, L.M.G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12:123-130.
- BIO-12/16-09/05 (2005). *Validation certificate for alternative analytical method according to standard EN ISSO 16140:2003*. AFAQ AFNOR certification. Bagneux, France.
- Blainski, A., Cristiny, G., Lopes, C., e Mello, J.C. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18:6852-6865.
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D., e Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112:374-380.
- Boulekbach-Makhlouf, L., Medouni, L., Medouni-Adrar, S., Arkoub, L., e Madani, K. (2013). Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Industrial Crops and Products*, 49:668-674.
- Bramorski, A., Cheren, A., Marmentini, C., Torresani, J., Mezdari, T., e Costa, A. (2010). Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and its components. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(4):651-653.
- Byrne, B., Dunne, G., e Bolton, D.J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiology*, 23:803-808.
- Calderón-Montaña, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., e López-Lázaro, M. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11:298-344.
- Cancer Research UK (2014). [recurso eletrônico]. *Childhood cancer incidence statistics*. Londres: Cancer Research UK. [Consult. 22/09/2014]. Disponível em <http://www.cancerresearchuk.org>.

- Caprioli, I., O'Sullivan, M., e Monahan, F.J. (2011). Interference of sodium caseinate in the TBARS assay. *Food Chemistry*, 124:1284-1287.
- Carbonell, A., Alemany, F., Merella, P., Quetglas, A., e Román, E. (2002). The by-catch of sharks in the western Mediterranean (Balearic Islands) trawl fishery. *Fisheries research*, 61:7-18.
- Chen, A.Y., e Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaemferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138:2099-2107.
- Chemat, F., e Cravotto, G. (2013). [recurso eletrônico]. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds – Theory and Practice*. 1ª Edição. London: Springer. [Consult. 04/10/2014]. Disponível em http://books.google.pt/books/about/Microwave_assisted_Extraction_for_Bioact.html?id=8MA8SWRDVVMC&redir_esc=y. ISBN: 978-1-4614-4829-7.
- Chen, Z., Bertin, R., e Frolidi, G. (2013). EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138:414-420.
- Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., e Lee, J. (2005). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99(2):381-387.
- Cordeiro, R., Fernandes, P.L., e Barbosa, L.A. (2009). Flaxseed and the effect of his compound on human breast cell. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3):727-732.
- Cousins, M., Adelberg, J., Chen, F., e Rieck, J. (2007). Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa* L.) grown in vitro. *Industrial Crops and Products*, 25:129-135.
- Culbertson, S.M., e Porter, N.A. (2000). Unsymmetrical azo initiators increase efficiency of radical generation in aqueous dispersions, liposomal membranes, and lipoproteins. *Journal of the American Chemical Society*, 122:4032-4038.
- Cushnie, T.P.T., e Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26:343-356.
- Dahle, L.K., Hill, E.G., e Holman, R.T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 98:253-261.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., e Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:48-54.

- Davis, C.D., Emenaker, N.J., e Milner, J.A. (2010). Cellular Proliferation, Apoptosis and Angiogenesis: Molecular targets for Nutritional Preemption of Cancer. *Seminars in Oncology*, 37(3):243-257.
- Delgado-Vargas, F., e Paredes-López, O. (2002). *The Color Phenomenon*. In: *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. 1ª Edição. EUA: CRC Press. ISBN: 1-58716-076-5.
- Dini, I., Tenore, G.C., e Dini, A. (2013). Effect of industrial and domestic processing on antioxidant properties of pumpkin pulp. *Food Science and Technology*, 53(1):382-385.
- DGRM (Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos) (2014). [recurso electrónico]. Portugal: Datapescas, Nº 101. [Consult. 29/10/2014]. Disponível em <http://www.dgrm.min-agricultura.pt/xportal/xmain?xpid=dgrm&xpgid=detPublicacao&detPublicacao>.
- Donaldson, M.S. (2004). Nutrition and cancer – A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3(19):1-21.
- Du, W-X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Mandrell, R., e Friedman, M. (2009). Antibacterial Effects of Allspice, Garlic, and Oregano Essential Oils in Tomato Films Determined by Overlay and Vapor-Phase Methods. *Food Microbiology and Safety*, 74(7):390-397.
- Duan, X., Zhang, W., Li, X., e Wang, B. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1):37–43.
- ECFF (European Chilled Food federation) (2006). [recurso electrónico]. *Recommendations for the production of prepackaged chilled food*. Europa: ECFF. [Consult. 30/09/2014]. Disponível em http://www.ecff.net/images/ECFF_Recommendations_2nd_ed_18_12_06.pdf.
- Eilati, E., Hales, K., Zhuge, Y., Fricano, K.A., Yu, R., Breemen, R.B.V., e Hales, D.B. (2013). Flaxseed enriched diet-mediated reduction in ovarian cancer severity is correlated to the reduction of prostaglandin E2 in laying hen ovaries. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89:179-187.
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., e Zucco, F. (1990). *Toxicity Tests with mammalian Cell Cultures*. In: *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*. 1ª Edição. Toronto: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-92506-3.
- Elbadrawy, E., e Sello, A. (2011). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry, In Press*.

- El-barbary, A.M., Khalek, M.A., Elsalawy, A.M., e Hazaa, S.M. (2011). Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, 33:179-185.
- Elvevoll, E. (2004). [recurso eletrônico]. *Fish waste and functional foods*. In: *Total Food 2004*. Inglaterra: Institute of Food Research. [Consult. 09/04/2014]. Disponível em <http://www.docmar.net/upload/Dokmntr/EdelEFish%20waste%20and%20functional%20foods.pdf>.
- Esatbeyoglu, T., Huebble, P., Ernst, I.M., Chin, D., Wagner, A.E., e Rimbach, G. (2012). Curcumin-from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51:5308-5332.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., e Bray, F. (2013a). [recurso eletrônico]. *GLOBOCAN 2012 v1.0 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. França: International Agency for Research on Cancer. [Consult. 23/9/2014]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lorlet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., e Bray, F. (2013b). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49:1374-1403.
- Fernandes, A.C., Barbosa, S., Silva, D., e Pestana, G. (2008). [recurso eletrônico]. *Relatórios científicos e técnicos*. Portugal: IPIMAR, Série digital nº46. [Consult. 29/10/2014]. Disponível em <https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/docweb/2008/Reln46final.pdf>.
- Forkink, M., Smeitink, J., Brock, R., Willems, P., e Koopman, W. (2010). Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797:1034-1044.
- Gálan, I., García, M.L., e Selgas, M.D. (2009). Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science*, 84(3):437-443.
- Gan, S.D., e Patel, K.R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:1-3.
- García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Morales-Medina, R., Guadiz, A., e Guadix, E.M. (2013). Discarded species in the west Mediterranean sea as sources of omega-3 PUFA. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115:982-989.

- Genç, I.Y., Esteves, E., Aníbal, J., e Diler, A. (2013). Effects of chilled storage on quality of vacuum packed meagre fillets. *Journal of Food Engineering*, 115:486-494.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S., e Brooks M.S. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7):859-877.
- Gianella, R. (1996). *Salmonella*. In: *Medical Microbiology*. 4ª Edição. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
- Gil-Chávez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, F., Heredia J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M., e González-Aguilar, G.A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: an Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12:5-23.
- Glass, K., e Marshall, K. (2013). *Clostridium botulinum*. In: *Foodborne Infections and Intoxications*. 4ª Edição. San Diego: Academic Press. ISBN: 978-0-12-416041-5.
- Gold, J.S., Bayar, S., e Salem, R.R. (2004). Association of Streptococcus bovis bacterium with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Archives of Surgery*, 139:760-765.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drezewiecki, J., Cvikrová, M., Martincová, O., Katrich, E, e Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:4418-4426.
- Gorris, L.G., e Peppelenbos, H.W. (1992). Modified Atmosphere and Vacuum Packaging to Extend the Shelf Life of Respiring Food Products. *HortTechnology*, 2(3):303-309.
- Gram, L, e Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:262-266.
- Hardman, W.E. (2002). Omega-3 Fatty Acids to Augment Cancer Therapy. *The Journal of Nutrition*, 132:3508-3512.
- Harper, C.R., Edwards, M.J., DeFilipis, A.P., e Jacobson, T.A. (2006). Flaxseed Oil Increases the Plasma Concentrations of Cardio protective (n-3) Fatty Acids in Humans. *The Journal of Nutrition*, 137:83-87.
- Hayes, W., e Kruger, C. (2014). *Hayer's Principles and Methods of Toxicology*. 6ª Edição. Nova Iorque: CRC Press. ISBN: 978-1-84214-537-1.
- Haytowitz, D.B., e Bhaqwat, S. (2010). [recurso eletrônico]. *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods - Release 2*. Maryland: U.S. Department of Agriculture. [Consult. 15/04/2014]. Disponível em <http://www.ars.usda.gov>.

- Huang, D., Ou, B., e Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841-1856.
- Huss, H.H. (1993). [recurso eletrônico]. *Traditional Microbiological Quality Control*. In: *Assurance of seafood quality*. Roma: FAO Fisheries Technical Paper, nº334. [Consult. 06/09/2014]. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/003/t1768e/t1768e04.htm>. ISBN 92-5-103446.
- Huss, H.H. (1995). [recurso eletrônico]. *Quality and quality changes in fresh fish*. Roma: FAO Fisheries Technical Paper, nº348. [Consult. 06/09/2014]. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180e07.htm>. ISBN: 92-5-103507-5.
- Igney, F.H., e Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2:277-288.
- Iliev, A.I., Ludneva, D.P., Kalchea-Karadzova, K.D., e Kozarekoca-Yovkova, D.T. (2013). [recurso eletrônico]. *Antioxidant Activity and Polyphenol Content in Garlic After Drying and Unsealed Storage*. Food, Technologies & Health: Food Research & Development Institute. [Consult. 15/10/2014]. Disponível em http://www.canri.org/conferencia_2013/docs/surovini/03-Iliev_st_chesun_ENGIIRH_v2.pdf.
- IFST (Institute of Food Science Technology) (1999). *Development and use of microbiological criteria for foods*. 1ª Edição. London: IFST. ISBN: 0-905367-16-2.
- IFT (Institute of Food Technologists) (2004). [recurso eletrônico]. *Functional Foods: Opportunities and Challenges*. Chicago: IFT. [Consult. 01/10/2014]. Disponível em <http://www.ift.org/Food-Technology/Past-Issues/2004/December/Features/Functional-Foods-Opportunities-and-Challenges.aspx>.
- INE (Instituto Nacional de Estatística) (2012). [recurso eletrônico]. *Estatística da Pesca 2011*. 1ª Edição. Portugal: Instituto Nacional de Estatística. [Consult. 24/01/14]. Disponível em <http://www.dgrm.min-agricultura.pt>. ISSN 978-989-25-0156-7.
- IRO Group (2014). [recurso eletrônico]. *EasyRGB*. IRO Group Limited. [Consult. 04/09/2014]. Disponível em <http://www.easyrgb.com>. Simulador *online*.
- ISO6887-1 (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. Geneva, Suíça.

- ISO6887-3 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*. Geneva, Suíça.
- ISO7218 (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations*. Geneva, Suíça.
- ISO7402 (1993). *Microbiology. General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation - MPN technique and colony-count technique*. Geneva, Suíça.
- ISO16649-2 (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive E.coli -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*. Geneva, Suíça.
- ISO21528-2 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method*. Geneva, Suíça.
- Itle, R.A., e Kabelka, E.A. (2009). Correlation Between L*a*b* Color Space Values and Carotenoid Content in Pumpkins and Squash (*Cucurbita* spp). *HortScience*, 44(3):633-637.
- Jayakumar, R., e Kanthimathi, M.S. (2012). Dietary spices protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage and inhibit nicotine-induced cancer cell migration. *Food Chemistry*, 134:1580-1584.
- Johnson, E.A. (2009). *Clostridia*. In: *Encyclopedia of Microbiology – Volume 2*. 3ª Edição. Massachusetts: Academic Press. ISBN: 978-0-12-373944-5.
- Kadam, S.U., e Prabhasankar, P. (2010). Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43:1975-1980.
- Kaefer, C.M., e Milner, J.A. (2008). The Role Of herbs and spices in Cancer Prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6):347-361.
- Karami, M., Alimon, A.R., e Goh Y.M. (2011). Effect of vitamin E, *Andrographis paniculata* and turmeric as dietary antioxidant supplementation on lipid and color stability of goat meat. *Small Ruminant Research*, 97:67-71.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441:431-436.
- Karin, M., e Lin, A. (2002). NF-κB at the crossroad of life and death. *Nature Publishing*, 3:221-227.
- Keledjian, A., Brogan, G., Lowell, B., Warrenchuk, J., Enticknap, B., Shester, G., Hirshfield, M., e Cano-Stocco, D. (2014). [recurso eletrônico]. *Wasted Catch: Unsolved Problems*

- In U.S. Fisheries*. Washington: OCEANA. [Consult. 09/04/2014]. Disponível em http://oceana.org/sites/default/files/reports/Bycatch_Report_FINAL.pdf.
- Key, T.J., Schatzkin, A., Willett, W.C., Allen, N.E., Spencer, E.A., e Travis, R.C. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutrition*, 7(1A):187-200.
- Kraushik, N. (2010). Functional Foods: Overview and Global Regulation. *International Journal of Pharma Recent Research*, 2(2):47-52.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M. Binkoski, A., Hilpert, K.F. Griel, A.E., e Etherton, T.D. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of cardiovascular Disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113:71-88.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., e Georgakilas, A.G. (2010). Role of oxidative stress and DNA in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711:193-201.
- Kuno, T., Tsukamoto, T., Hara, A., e Tanaka, T. (2012). Cancer chemopreventive through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*, 3(2):156-173.
- La Vecchia, C., Bosetti, C., Lucchini, F., Bertuccio, P., Negri, E., Boyle, P., e Levi, F. (2010). Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Annals of Oncology*, 21:1323-1360.
- Lai, L., Fu, Q., Liu, Y., Guo, Q., Chen, Q., Yan, B., Wang, Q., e Shen, J. (2012). Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vitro in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33:523-530.
- Lee, K.A., Kim, K., Nah, S., Chung, M., Cho, S., e Paik, H. (2011). Antimicrobial and Antioxidative Effects of Onion peel Extracted by the Subcritical Water. *Food Science and Biotechnology*, 20(2):543-548.
- Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., e Taylor, D.K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129:570-576.
- Lin, C., e Lin, J. (2008). Curcumin: a Potential Cancer Chemopreventive agent through suppressing NF- κ B Signaling. *Journal of Cancer Molecules*, 4(1):11-16.
- Liu, R.H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12):3479-3485.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., e Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8):118-126.

- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R., Rang, J., e Rasco, B.A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129:637-644.
- Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., e Sullivan, R. (2013). Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncology*, 14:1165-1174.
- Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H. e Karin, M. (2004). Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 6:297-305.
- Ly, J.D., Grubb, D.R., e Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8:155-128.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand C., Rémésy, C., e Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727-747.
- Marinho, Daniela, e Norte, Kelly. *Formulation of an antioxidant recipe prepared from undervalued fish*. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, 2012. Projeto de final de curso.
- Masniyom, P. (2011). Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(2):181-192.
- Meghwal, M., e Goswami, T.K. (2013). Review - Piper nigrum and Piperine: An Update. *Phytotherapy Research*, 27:1121-1130.
- Molfese, C., Beare, D., Hall-Spencer, J.M. (2014). Overfishing and the Replacement of Demersal Finfish by Shellfish: An Example from the English Channel. *In Press*.
- Moreira, M.M., Morais, S., Barros, A.A., Delerue-matos, C., e Guido, L.F. (2012). A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403:1019-1029.
- Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Hara, A., e Tanaka, T. (1999). Control of cell proliferation in cancer prevention. *Mutation Research*, 428:291-298.
- Moser, D.P., e Nealson, K.H. (1996). Growth of the Facultative Anaerobe *Shewanella putrefaciens* by Elemental Sulfur Reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6):2100-2105.

- Mozaffarian, D., e Wu, J.H.Y. (2011). Omega-3 fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(20):2047-2067.
- Mueller, L., e Boehm, V. (2011). Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. *Molecules*, 16:1055-1069.
- NCI (National Cancer Institute) (2012). [recurso eletrônico]. *Obesity and Cancer Risk*. Maryland: National Institutes of Health. [Consult. 29/10/2014]. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/obesity>.
- Niki, E. (2012). Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Letters*, 586:3767-3770.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., e Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical research Communications*, 338:668-676.
- NMKL n°86 (2003). *Aerobic microorganisms. Determination in foods at 37 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, 17/7 °C or 6.5 °C by the colony count method*. The General Secretaria of NMKL, Noruega.
- Nuutila, A.M., Puupponen-Pimiä, Aarni, M., Oksman-Caldentey, K. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81:485-493.
- Noguchi, N., Takahashi, M., Tsuchiya, J., Yamashita, H., Komuro, e Niki, E. (1998). Action of 21-Aminosteroid U74006F as an antioxidant Against Lipid Peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 55: 785-791.
- NP (Norma Portuguesa) 2262 (1986). *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- NP (Norma Portuguesa) 3356 (2002). *Pescado. Determinação do índice do ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método espectrofotométrico*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.
- Nuutila, A.M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M., e Oksman-Caldentey, K. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81:485-493.
- OCEANA (2011). [recurso eletrônico]. *By-Catch and Discard Management: The Key to Achieving Responsible and Sustainable Fisheries in Europe*. Washington: OCEANA. [Consult. 09/04/2014]. Disponível em

- http://oceana.org/sites/default/files/reports/OCEANA_By-Catch_and_Discard_Management.pdf
- Olafsdottir, G., Nesvabda, P., Natale, C.D., Careche, M., Oehlenschläger, Tryggvadóttir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., e Jørgensen, B. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science & Technology*, 15:86-93.
- Özogul, F., e Polat, A., e Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory, and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 85(1):49-57.
- Palozza, P., Simone, R.E., Catalano, A., e Mele, M.C. (2011). Tomato Lycopene and Lung Cancer Prevention: From Experimental to Human Studies. *Cancers*, 3:2333-2357.
- Pan, X., Niu, G., e Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42:129-133.
- Pang, G., Xie, J., Chen, Q., e Hu, Z. (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food science and Human Wellness*, 1:26-60.
- Paruch, A.M., e Mæhlum, T. (2012). Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*, 23:140-142.
- Patras, A., Brunton, N., Pieve, S.D., Butler, F., e Downey, G. (2009). Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10:16-22.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., e Sirichakwal, P.P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:241-248.
- Pastoriza, L., e Bernárdez, M. (2011). Salmon in modified atmospheres using high- and low-barrier packaging materials. *Journal of Food*, 9(2):126-130.
- Pazo, T.O., Antelo, L.T., Franco-Úria, A., Pérez-Martín, R.I., Sotelo, C.G., e Alonso, A.A. (2014). Fish discards management in selected Spanish and Portuguese métiers: identification and potential valorisation. *Trends in Food Science & Tecnology*, 36:29-43.
- Pedrosa, R., e Soares-da-Silva, P. (2002). Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *British Journal of Pharmacology*, 137: 1305 – 1313.

- Peek, R.M., e Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer*, 2:28-37.
- Pereira, M., Peleteiro, B., Capewell, S., Bennett, K., Azevedo, A., e Lunet, N. (2012). Changing patterns of cardiovascular diseases and cancer mortality in Portugal, 1980-2010. *BMC Public Health*, 12:1126.
- Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., e Rosmini, M.R. (2006). *Chemical and Physical aspects of color in frozen muscle-based foods*. In: *Handbook of Food Science Technology and Engineering - Volume 2*. 1ª Edição. Estados Unidos da América: CRC Press. ISBN: 978-0-8493-9848-3.
- Pinchuk, I., Shoal, H., Dotan, Y., e Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165:638-647.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., e Ferreira, I.C. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4):829-834.
- Pisoschi, A.M., e Negulescu, G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1(1):106.
- Poljšak, B., e Raspor, P. (2008). The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *Journal of Applied Toxicology*, 28:183-188.
- Prasad, M.M., e Seenayya, G. (2000). Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research International*, 33:793-798.
- Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K., e Aggarwal, B.B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, 32(6):1053-1064.
- Prior, R.L., Wu, X., e Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4290-4302.
- PHAC (Public Health Agency of Canada) (2011). [recurso eletrônico]. *Healthy living can prevent disease*. Canada: Public Health Agency. [Consult. 17/10/2014]. Disponível em http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/healthy_living-vie_saine-eng.php.
- Radha krishnan, K., Babuskin, S., Azhagu Saravana Babu, P., Sasikala, M., Sivarajan, M., e Sukumar, M. (2013). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 171:32-40.

- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahama, D.K., e Kumar, M.N.V.R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113:189-207.
- Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gélinas, C., Fuchs, E.J., e Bedi, A. (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nature Cell Biology*, 3:409-416.
- Ravindram, J., Prasad, S, e Aggarwal, B.B. (2009). Curcumin and Cancer Cells: How many Ways Can Curry Kill Tumor Cells selectively? *The AAPS Journal*, 11(3):495-510.
- Réblová, Z. (2012). Effect of Temperature on the Antioxidant Activity of Phenolic Acids. *Czech Journal Food Science*, 30(2): 171-177.
- Reddy, S.V., Srinivas, P.V., Praveen, B., Kishore, K.H., Raju, B.C., Murthy, U.S., e Rao, J.M. (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, 11:697-700.
- Reis, I.A.O., Santos, S.B., Santos, L.A., Oliveira, N., Freire, M.G., Pereira, J.F.B., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., e Lima, A.S. (2012). Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*, 135:2453-2461.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M., e Zagorec, M. (2014). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology, In Press*.
- Repetto, M., Sempine, J., e Boveris, A. (2012). [recurso eletrônico]. *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination*. In: *Lipid Peroxidation*. 1ª Edição. Croácia: Intech. [Consult. 23/09/2014]. Disponível em <http://dx.doi.org/10.5772/45943>. ISBN 978-953-51-0716-3.
- Revill, A.S., Dulvy, N.K., e Holst, R. (2005). The survival of discarded lesser-spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) in the Western English Channel beam trawl fishery. *Fisheries Research*, 71:121-124.
- Robert, V., Mouillé, B., Mayeur, C., Michaund, M., e Blachier, F. (2001). Effects of the garlic compound diallyl disulfite on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant sub-populations. *Carcinogenesis*, 22(8):1155-1161.
- Rodríguez-Cabello, C., Fernández, A., Olaso, I., Sánchez, F., Gancedo, R., Punzón, A., e Cendrepo, O. (2005). Overview of Continental Shelf Elasmobranch Fisheries in the Cantabrian Sea. *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Science*, 35:375-385.

- Sant'Anna, V., Gurak, P.D., Marczak, D.F., e Tessaro, I.C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98:601-608.
- Schmidt, H. (1959). Thiobarbituric Acid Number as Measurement of The Oxidation of Edible Fats. *Fette Seifen Anstrichm*, 61:127-133.
- Sethi, G., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., e Aggarwal, B.B. (2009). *Targeting TNF for Treatment of Cancer and Autoimmunity*. In: *Therapeutic Targets of the TNF Superfamily – Advances in Experimental Medicine and Biology - Volume 647*. 1ª Edição. Estados Unidos da América: Landes Bioscience. ISBN: 978-1-4419-2799-6.
- Setyaningsih, W., Saputro, I.E., Palma, M., e Barroso, C.G. (2015). Optimization and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169:141-149.
- Shan, B., Cai, Y., Brooks, J.D., e Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117:112-119.
- Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., e Reaney, M.J.T. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Foods Science & Technology*, 38:5-20.
- Siddiq, M., Roidoung, S., Sogi, D.S., e Dolan, K.D. (2013). Total phenolics, antioxidant properties and quality of fresh-cut onions (*Allium cepa* L.) treated with mild-heat. *Food Chemistry*, 136:803-806.
- Siegel, D.A., King, J., Tai, E., Buchanan, N., e Li, J. (2014). Cancer incidence Rates and Trends Among Children and Adolescents in the United States, 2001-2009. *Pediatrics*, 134(4):945-955.
- Siegel, S., e Castellan, N.J. (1988). *Nonparametric Tests*. In: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2ª edição. Nova Iorque: McGraw-Hill. ISBN: 9780070573573.
- Singh, A., e Duggal, S. (2009). Piperine – Review of Advances in Pharmacology. *Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(3): 615-620.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J. e Minor, L. (2004). [recurso eletrônico]. *Cell Viability Assays*. In: *Assay Guidance Manual*. Maryland: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>. PMID: 22553861.
- Steliarova-Foucher, E., O'Callaghan, M., Ferlay, J., Masuyer, E., Forman, D., Comber, H., e Bray, F. (2012). [recurso eletrônico]. *European Cancer Observatory: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in Europe - Version 1.0*. Europa: European Network

- of Cancer Registries International. [Consult. 22/09/2014]. Disponível em <http://eco.iarc.fr>.
- Stewart, B., e Wild, C.P. (2014). [recurso eletrônico]. *World Cancer Report 2014*. 1ª Edição. Londres: International Agency for Research on Cancer – WHO Press. [Consult. 22/09/2014]. Disponível em <http://apps.who.int/>. ISBN: 9789283204299.
- Sun, Z.J., Chen, G., Hu, X., Zhang, W., Liu, Y., Zhu, L.X., Zhou, Q., e Zhao, Y.F. (2010). Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NK-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetina. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15:850-863.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., e Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21:1199-1218.
- Teh, S., e Birch, J. (2013). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30:26-31.
- Ternay, A.L., e Sorokin, V. (1997). [recurso eletrônico]. *Redox, radicals and antioxidants*. In: *Oxidants, Antioxidants and free radicals*. 1ª Edição. Estados Unidos da América: Taylor & Francis. [Consult. 15/09/2014] Disponível em <http://books.google.pt/books?id=4El0qzew9vgC&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>. ISBN: 1-56032-644-1.
- Tirzitis, G., e Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta ABP Biochimica Polonica*, 57(1):139-142.
- Tiwari, B.K., Brunton, N.P., e Brennan, C.S. (2013). [recurso eletrônico]. *Chemistry and classification of phytochemicals*. In: *Handbook of Plant Food Phytochemicals – Sources, stability and extraction*. 1ª Edição. Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd. [Consult. 13/09/2014]. Disponível em <http://books.google.pt/books?id=Wz7sUPOqKvAC&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+Plant+Food+Phytochemicals&hl=pt-PT&sa=X&ei=9NsuVKrVLYKqOtWYgNAD&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. ISBN: 978-1-118-46471-7.
- Trajano, V.N., Lima, E.O., Souza, E.L., e Travassos, A.E.R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3):542-545.
- Trust, S. (2009). [recurso eletrônico]. *ID Guide – Small spotted Catshark*. Devon: The Shark Trust. [Consult. 12/09/2014]. Disponível em <http://www.sharktrust.org/id>.

- Trust, S. (2011). [recurso eletrônico]. *The British Isles and Northeast Atlantic*. In: *An Illustrated Compendium of Sharks, Skates, Rays and Chimaera – Part 2: Sharks*. Devon: The Shark Trust. [Consult. 12/09/2014]. Disponível em <http://www.sharktrust.org>.
- Trust, S. (2014). [recurso eletrônico]. Least Concern (LC) in the Northeast Atlantic. Inglaterra: Shark Trust. [Consult. 30/10/2014]. Disponível em http://www.sharktrust.org/en/iucn_least_concern.
- Tsai, C., Chen, H., Sheen, L., e Li, C. (2012). Garlic: Health benefits and actions. *BioMedicine*, 2:17-29.
- Upadhyay, V., Sharma, N., Joshi, H.M., Malik, A., Mishra, M., Singh, B.P., e Tripathi, S. (2013). Development and Validation of Rapid RP-HPLC Method for Estimation of Piperine in Piper nigrum L. *International Journal of Herbal Medicine*, 1(4):6-9.
- Velu, S., Abu Bakar, F., Mahyudin, N.A., Saari, N., e Zaman, M.Z. (2013). Effect of modified atmosphere packaging on microbial flora changes in fishery products. *International Food Research Journal*, 20(1):17-26.
- Venskutonis, P.R. (2014). [recurso eletrônico]. *Natural antioxidants in Food systems*. In: *Food oxidant and Antioxidants – Chemical, Biological and Functional Properties*. 1ª Edição. Flórida: CRC Press. [Consult. 21/09/2012]. Disponível em <http://books.google.pt/books?id=kGPPrnI02EkC&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>. ISBN: 978-1-4398-8242-9.
- Vulperhorst, V., Bialas, A., Todd, S., e Cornax, M.J. (2013). [recurso eletrônico] *European Fisheries subsidies: State Aid – The Hidden subsidies*. Washington: OCEANA. [Consult. 09/04/2014]. Disponível em http://oceana.org/sites/default/files/reports/OCEANA_State_aid_factsheet_072013.pdf
- Wang, Y., Lu, Z., Wu, H., e Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1):71-74.
- Wangcharoen, W., e Morasuk, W. (2009). Effect of heat treatment on the antioxidant capacity of garlic. *Journal of Science and Technology*, 3(1):60-70.
- Wattanathorn, J., Chonpathompikunlert, P., Muchimapura, S., Priprem, A., e Tankamnerdthai, O. (2008). Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 46(9):3106-3110.
- WHO (World Health Organization) (2009). [recurso eletrônico]. *World Health Risks*. In: *Global Health Risks - Mortality and burden of disease attributable to selected major*

- risks. Dinamarca: WHO Press. [Consult. 11/04/2014]. Disponível em <http://www.who.int>.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., e DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123:1173-1183.
- Wu, D., e Sun, D. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 29:5-20.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., e Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4026-4037.
- Yamamoto, Y., Haga, S., Niki, E., e Kamiya, Y. (1984). Oxidation of lipids. V. Oxidation of methyl linoleate in aqueous dispersion. *Bulletin of The Chemical Society of Japan*, 57(5):1260-1264.
- Yang, W., Fu, J., Yu, M., Huang, Q., Wang, D., Xu, J., Deng, Q., Yao, P., Huang, F., e Liu, L. (2012). Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids in Health and Disease*, 11:88.
- Yolken, R.H., e Stopa, P.J. (1979). Enzyme-Linked Fluorescence Assay: Ultrasensitive Solid-Phase Assay for Detection of Human Rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(3):317-321.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., e Qian, M. (2002). Free radical Scavenging properties of Wheat Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:1619-1624.
- Yuan, Y.V., e Walsh, N.A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*, 44:1144-1150.
- Zar, J.H. (2010). *Multisample Hypotheses and the Analysis of Variance*. In: *Biostatistical Analysis*. 5ª Edição. Illinois: Pearson. ISBN: 0131008463.
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Salem, N.B., Gargouri, Y., e Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT – Food Science and Technology*, 50:634-641.
- Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y., e Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, 81:686-692.

Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., e Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86:15-31.

Zill-e-Huma, Vian, M.A., Maingonnat, J.F., e Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216:7700-7707.