

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE**  
**TOMILHO E ORÉGANO EM MARINADO DE OSTRAS**

**MARIANA PEREIRA SANTANA REAL**

**CRUZ DAS ALMAS - BA**

**NOVEMBRO- 2018**

# **POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE TOMILHO E ORÉGANO EM MARINADO DE OSTRAS**

**MARIANA PEREIRA SANTANA REAL**

Nutricionista

Universidade do Estado da Bahia, 2015

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Norma Suely Evangelista\_Barreto

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Floricéa Magalhães Araújo

**CRUZ DAS ALMAS- BA**

**NOVEMBRO- 2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

R288p

Real, Mariana Pereira Santana

Potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos de tomilho e orégano em marinado de ostras / Mariana Pereira Santana Real. \_ Cruz das Almas, BA, 2019.

100.; il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista Barreto

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Floricéa Magalhães Araújo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas, Mestre em Microbiologia Agrícola.

1. Segurança Alimentar. 2. Microbiologia - Alimentos 3. Moluscos . I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 338.18

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**MARIANA PEREIRA SANTANA REAL**



Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista-Barreto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientador)



Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Maria Gardenny Ribeiro Pimenta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Karina Zanoti Fonseca  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_."

## DEDICATÓRIA

Ao meu Criador e Salvador, como sendo a fonte, o meio e o objetivo de tudo.

*“Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”*

(Romanos 11:36)

## AGRADECIMENTOS

*“Ebenézer: Até aqui o Senhor nos ajudou!” (1 Samuel 7:12)*

Agradeço primeiramente a DEUS, Autor e Consumador da minha fé, pela inspiração, sustento, provisão e por todas as bênçãos diárias concedidas.

À minha querida mãe, Bernadete, por toda força, incentivo, paciência e por sempre acreditar em mim. Dedico essa dissertação à senhora!

À toda minha família por sempre confiarem e acreditarem em mim.

À Suelen, Thiane, Paulo, Edvaldo, Nei Jackson, que desde sempre me acompanham e torcem por mim. Sem o incentivo de vocês tudo isso não teria sentido!

Aos meus irmãos em Cristo: Natividade, Bernadete, Jane, Mag, Pr. Bruno, Pr. Robson e Pr. Antônio pelas orações e súplicas.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista-Barreto pela orientação e conhecimentos compartilhados.

À minha Coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Floricea Magalhães Araújo (Flor) por todo conhecimento compartilhado, amor e dedicação.

Aos colegas do grupo de estudos Fitoquímicos, Etnobotânicos e de Atividades Biológicas- FITOETNOBIO e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental - LABMA que de alguma forma me ajudaram.

Ao Thulio Victor, Mariana Mendes, Ana Valéria, Dona Clarice e Peterson por toda força, companheirismo e contribuição. Vocês foram verdadeiros anjos em minha vida!

À minha turma, 2016.2, do mestrado em microbiologia agrícola pelos conhecimentos e alegrias compartilhadas.

Aos Técnicos Luiza, Alisson, Washington, Márcio, Breno e Fabrício por toda ajuda durante a execução deste trabalho.

À todos os funcionários da UFRB que me ajudaram, pois foram muitos.

Por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuiu quer seja na execução ou com uma simples palavra de incentivo, agradeço imensamente de todo o meu coração!

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABTS** - Radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

**ANOVA** - Análise de Variância

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BHT** - Butil hidroxi tolueno

**CBM** - Concentração Bactericida Mínima

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CLSI** - National Committee for Clinical Laboratory Standard

**DPPH** - Radical (2,2-Diphenyl-picrilhidrazil)

**Log** - Logarítimo

**mg/mL** - Miligrama /mililitro

**mL** - Mililitro

**°C** - Grau Celsius

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**µL** - Microlitro

**UV** - ultravioleta



## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Informação nutricional da composição química de ostras cruas em uma porção de 100 g. Valor calórico: 81,0 kcal.	<b>25</b>
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabela 1.</b> Análise fitoquímica preliminar dos extratos aquosos de orégano e tomilho.	<b>68</b>
<b>Tabela 2.</b> Atividade antioxidante (EC <sub>50</sub> ) dos extratos aquosos de orégano e tomilho por meio dos métodos DPPH, ABTS e poder redutor.	<b>69</b>
<b>Tabela 3.</b> Teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos aquosos de orégano e tomilho.	<b>70</b>
<b>Tabela 4.</b> Atividade antimicrobiana (CIM e CBM) dos extratos aquosos de orégano e tomilho frente a bactérias Gram positivas e negativas.	<b>71</b>
<b>Tabela 5.</b> Contagens média do número de bactérias psicotróficas nos marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>72</b>
<b>Tabela 6.</b> Contagem média de <i>S. aureus</i> em marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>73</b>
<b>Tabela 7.</b> Valores de pH dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>75</b>
<b>Tabela 8.</b> Composição centesimal dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>76</b>
<b>Tabela 9.</b> Teor de flavonoides dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>78</b>
<b>Tabela 10.</b> Matriz de correlação dos componentes principais rotacionados das características e atributos, autovalor e percentagem de variação nas CPs para os tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.	<b>38</b>
<b>Figura 2.</b> Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.	<b>39</b>
<b>Figura 3.</b> Prancha botânica de <i>Thymus vulgaris</i> L.	<b>40</b>
<b>Figura 4.</b> Prancha botânica de <i>Origanum vulgare</i> L.	<b>42</b>
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Fluxograma do processamento do marinado de ostras usando a tecnologia de obstáculos.	<b>62</b>
<b>Figura 2.</b> Fluxograma elaborado para o processamento dos marinados de ostras na segunda etapa do experimento.	<b>63</b>
<b>Figura 3.</b> Autovalores e autovetores da configuração das características relacionadas ao diagrama de posicionamento dos centróides dos tratamentos de marinados de ostras avaliados aos 90 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração.	<b>77</b>
<b>Figura 4.</b> Autovalores e autovetores da configuração e diagrama de ordenação das características e atributos para os tratamentos de marinados de ostras.	<b>81</b>

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1. Hipótese.....	18
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Risco do consumo de ostras e emprego da técnica de marinação associada a extratos de plantas medicinais no controle microbiológico: uma revisão .....	20
1.Aspectos da produção de moluscos bivalves .....	23
2. Consumo de ostras: aspectos nutricionais e segurança alimentar .....	24
3. Consumo de ostras e surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA) ...	26
3. Microrganismos patogênicos em moluscos bivalves.....	29
4. Processo de marinação .....	31
5.1 Função dos ingredientes na estabilidade dos produtos marinados.....	33
6.Compostos bioativos: uma alternativa à indústria de alimentos.....	35
6.1 Família Lamiaceae: caracterização geral.....	39
6.1.1 Tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> L.).....	40
6.1.2 Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) .....	41
7. REFERÊNCIAS .....	44
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Marinados de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) associado aos extratos de orégano e tomilho: uma contribuição tecnológica .....	53
1. INTRODUÇÃO .....	56

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
2.1 Material vegetal.....	57
2.2 Preparo do extrato aquoso.....	57
2.4.1 Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	58
2.4.2 Método 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) .....	59
2.4.3 Poder redutor .....	59
2.5 Determinação de fenóis totais.....	59
2.6 Teor total de flavonoide.....	60
2.8 Elaboração das conservas marinadas de ostras.....	61
2.10 Análises físico-químicas.....	64
2.10.1 Umidade e cinzas .....	64
2.10.2 Lipídeos .....	65
2.10.3 pH .....	65
2.10.4 Bases voláteis totais (N-BVT) .....	65
2.10.5 Determinação de carboidratos solúveis .....	65
2.10.6 Teor de proteína bruta e nitrogênio.....	66
2.10.7 Minerais .....	66
2.11 Análise sensorial .....	66
2.12 Análises estatísticas.....	67
3.1 Rendimento dos extratos .....	67
3.4. Atividade antibacteriana dos extratos de tomilho e orégano .....	70
3.4. Estabilidade microbiológica dos marinados .....	72
3.2 Composição centesimal dos marinados.....	75
3.2 Teor de flavonoides nos marinados de ostras.....	78
3.3 Análise sensorial .....	79
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## RESUMO

### REAL, M. P. S. Potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos de tomilho e orégano em marinado de ostras

O consumo de ostras in natura oferece riscos aos seres humanos devido a sua capacidade de filtração e possível bioacumulação de microrganismos patogênicos. A técnica de marinação é um tratamento pós-captura baseada na imersão do conteúdo cárneo em salmoura ácida e adicionado de especiarias. As plantas das espécies *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) são de grande interesse medicinal principalmente por apresentarem efeito antimicrobiano e antioxidante. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de marinados de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) contendo os extratos de orégano e tomilho. Foram desenvolvidos 9 tratamentos de marinados em duas etapas distintas. A primeira consistiu no emprego da tecnologia dos obstáculos (3 tratamentos) e na segunda a utilização dos ingredientes separadamente (5 tratamentos), armazenadas sob refrigeração ( $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 120 dias. Estudos in vitro das propriedades fitoquímicas e antimicrobianas dos extratos foram realizados antes da sua aplicação nas formulações. As ostras e marinados foram avaliadas mediante análise físico-química e microbiológica. Além disso, foi realizada análise sensorial para melhor qualificação do produto final. Os extratos de orégano e tomilho apresentaram atividade antimicrobiana e antioxidante no estudo in vitro. Os tratamentos em que foram empregados a tecnologia dos obstáculos se mostraram inócuas ao longo de 120 dias sob refrigeração. Em virtude do baixo pH, o tratamento com ácido acético (AAC) foi o mais eficiente entre tratamentos em que os ingredientes foram avaliados separadamente, inibindo completamente o crescimento de psicotróficos e *Staphylococcus aureus*. Os resultados do tratamento com extrato de orégano (EOR) e do tratamento com extrato de tomilho (ETO) foram equivalentes aos achados na atividade antimicrobiana in vitro, embora estes não se mostrem tão eficientes para as bactérias psicotróficas. Sob os aspectos físico-químicos, com exceção dos teores de lipídeos, sódio e bases voláteis totais, foi possível perceber uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos teores de carboidrato, proteína, nitrogênio, fósforo, zinco, cálcio, potássio e umidade durante o armazenamento. O Índice de

Aceitabilidade sensorial das formulações de marinados foi de 77,50 - 83,21%. A técnica de marinação pode contribuir significativamente para melhor aproveitamento das ostras e quando enriquecidos com compostos bioativos além de agregar valor à matéria-prima, fornece benefícios aos consumidores.

**Palavras-chave:** Bactérias. Segurança alimentar. Moluscos.

## ABSTRACT

### **REAL, M. P. S. Antimicrobial and antioxidant potential of thyme and oregano extracts in oyster marinade**

The ingestion of oysters “in natura” offers risks to humans due to their capacity of filtration and possible bioaccumulation of pathogenic microorganisms. The marination technique is a post-capture treatment based on immersion of the meat content in acidic brine and spices. Plants of the species *Origanum vulgare* (oregano) and *Thymus vulgaris* (thyme) are of great medicinal interest mainly because of their antimicrobial and antioxidant effect. The present study aimed to develop oyster marinades (*Crassostrea rhizophorae*) containing the extracts of oregano and thyme. Nine treatments of marinades were developed in two stages: The first consisted of using the barrier technology (3 treatments) and the second the use of the ingredients separately (5 treatments), stored under refrigeration ( $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) for 120 days. “In vitro” studies of the phytochemical and antimicrobial properties of the extracts were performed prior to their application in the formulations. Oysters and marinades were evaluated by physical-chemical and microbiological analysis. In addition, a sensorial analysis was performed to qualify the final product. The extracts of oregano and thyme presented antimicrobial and antioxidant activity in the “in vitro” study. The treatments in which the technology of the obstacles were used proved to be innocuous during the 120 days under refrigeration. Due to the low pH, acetic acid (AAC) treatment was the most efficient among treatments in which the ingredients were evaluated separately, inhibiting the growth of psychotrophic and *Staphylococcus aureus* completely. The results of treatment with oregano extract (EOR) and thymoid extract (ETO) treatment were equivalent to those found in antimicrobial activity “in vitro”, although these were not as efficient for psychotrophic bacteria. A significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) was observed in the carbohydrate, protein, nitrogen, phosphorus, zinc, calcium, potassium and moisture during storage. The Sensory Acceptability Index of marinade formulations was 77.50 - 83.21%. The marination technique can contribute significantly to the better use of oysters and when enriched with bioactive compounds besides adding value to the raw material, provides benefits to consumers.

**Keywords:** Bacteria. Food safety. Molluscs.



# INTRODUÇÃO

O cultivo de ostras ou seu extrativismo tem se mostrado uma importante fonte de subsistência para as populações costeiras. Além disso, as ostras são uma fonte alternativa de alimento rico em proteínas, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais (GERMANO; GERMANO, 2008; SOARES; GONÇALVES, 2012).

Apesar da sua elevada importância nutricional, garantir a segurança alimentar dos moluscos bivalves, especialmente as ostras, que em sua maioria são consumidas cruas, se constitui um desafio, devido à capacidade desses organismos filtrarem e bioacumularem em seus tecidos elevadas concentrações de microrganismos patogênicos, presentes nas águas poluídas que circundam as áreas de cultivo ou os bancos naturais (JAY, 2005; PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Dessa forma, o consumo de moluscos crus se mostra um grande risco à saúde dos consumidores pelo fato desses alimentos serem responsáveis por diversos casos de surtos alimentares (PEREIRA et al, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil, durante o período de 2007 a 2016 foram notificados 6.632 surtos de doenças veiculadas por alimentos tendo como principal agente etiológico bactérias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2016).

Dentre os principais microrganismos isolados de ostras se destacam os gêneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Micrococcus* (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Desses merecem destaque as bactérias do gênero *Salmonella* e *Shigella*. que são encontradas em águas contaminadas por esgotos ou excretas animais. Como bactérias autóctones do ambiente marinho tem-se ainda as espécies de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae* importantes por se encontrarem envolvidas em surtos alimentares (GERMANO; GERMANO, 2008).

Um dos métodos usados para assegurar o controle sanitário dos produtos da pesca é o processo de marinação. Esta técnica é baseada na conservação e preservação do pescado por meio do processo osmótico com uma solução de cloreto de sódio e ácidos orgânicos, além da adição de especiarias (GONÇALVES, 2011).

Produtos submetidos à marinação possuem propriedades sensoriais típicas, além de propiciar o melhoramento da textura, propriedades estruturais e amaciamento da carne. Além disso, as condições ácidas (pH 4,0 - 4,5) dos produtos marinados fornecem condições desfavoráveis ao desenvolvimento e crescimento de muitas espécies bacterianas (PORTO et al., 2000; BURKE; MOHANAN, 2003; GONÇALVES, 2011).

Nessa perspectiva, a utilização de compostos bioativos presentes em especiarias tem sido uma alternativa desejável como uma barreira adicional no processo de marinação objetivando melhorar a eficiência da técnica no controle microbiológico, além de um ingrediente alternativo para a obtenção de um produto marinado com *flavour* diferenciado. Por outro lado, a busca de compostos naturais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes presentes em plantas tem se intensificado, pois a extração de compostos fitoquímicos apresenta grande potencial na inativação de enzimas e microrganismos aumentando a segurança de alimentos (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011). Além de atuar como um substituto aos conservantes sintéticos, como por exemplo, benzoato de potássio, usado em conservas de alimentos.

Embora os aditivos químicos atuem como conservantes e antioxidantes de forma a garantir e manter as características sensoriais dos alimentos, estudos vêm demonstrado diversos impactos à saúde quanto à utilização inadequada desses componentes, como o aparecimento de câncer, alergias e outras enfermidades (HONORATO et al., 2013).

Dessa forma, uma das alternativas frente a essa problemática é a utilização de espécies vegetais. As espécies *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Thymus vulgaris* L (tomilho), ambas da família *Lamiacea*, embora sejam utilizadas como ingredientes na culinária e na preparação de infusões na medicina popular, vêm demonstrando diversas atividades de interesse farmacêutico, químico e

principalmente para a indústria de alimentos por possuírem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (VANACLOCHA; CAÑIGUERAL, 2003; IMELOUANE et al., 2009 SAEED; TARIQ, 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010; QUIROGA et al., 2013), portanto, é promissor o emprego do seu extrato na preservação dos alimentos.

Esta dissertação está dividida dois capítulos, em que nesta primeira parte introdutória apresento a pesquisa e algumas considerações sobre a temática escolhida, bem como os objetivos norteadores do presente estudo.

No capítulo 1 é apresentado uma revisão de literatura acerca dos aspectos morfológicos, socioeconômicos, nutricionais e microbiológicos das ostras e produtos marinados, enquanto no capítulo 2 é apresentado o trabalho de pesquisa com a exposição das características fitoquímicas dos extratos de orégano e tomilho, bem como o estudo do seu potencial antimicrobiano e antioxidante. Apresentamos ainda a posposta do produto marinado adicionado dos extratos das plantas e a estabilidade do produto por 120 dias.

## **1. HIPÓTESE**

- Os extratos vegetais de orégano e tomilho apresentam atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Os extratos vegetais de orégano e tomilho em marinado de ostras são eficientes para minimizar a carga microbiana das ostras e apresentam propriedades antioxidantes que auxiliam na estabilidade do produto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de orégano e tomilho, e a sua utilização como barreira adicional na conservação de marinados de ostras.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as classes de metabólitos secundários do extrato aquoso das espécies *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) a partir da análise fitoquímica qualitativa.
- Verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato aquoso de orégano e tomilho.
- Desenvolver formulações de marinado de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) contendo os extratos vegetais.
- Analisar a eficiência do extrato aquoso de orégano e tomilho nos marinados de ostras.
- Avaliar a estabilidade das formulações dos marinados por meio dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

---

## **REVISÃO DE LITERATURA**

**Risco do consumo de ostras e emprego da técnica de marinação associada a extratos de plantas medicinais no controle microbiológico: uma revisão**

Artigo a ser submetido à Revista Brazilian Journal of Food Technology

---

## RESUMO

### **REAL, M. P. S. Risco do consumo de ostras e emprego da técnica de marinação associada a extratos de plantas medicinais no controle microbiológico: uma revisão**

A ostra é um animal invertebrado pertencente ao filo Mollusca, classe Bivalvia. Devido a sua capacidade de filtração e bioacumulação as ostras podem concentrar em seus tecidos elevada carga de microrganismos patogênicos, presentes nas águas de cultivo ou em bancos naturais. Com isso, embora seja considerada uma excelente fonte de alimento o consumo de ostras in natura oferece riscos aos seres humanos se revelando como potente veículo de doenças. Um dos métodos de tratamento pós-captura que visa assegurar o controle sanitário desses organismos é o processo de marinação. Esta técnica, além de ampliar as opções de consumo do pescado possibilita a melhoria dos atributos sensoriais, conforme composição da salmoura utilizada, com o aumento da vida comercial de alimentos perecíveis. Nessa perspectiva, a utilização de compostos contendo antimicrobianos naturais associados ao processo de marinação visa aumentar a eficiência desta técnica permitindo melhor controle microbiológico, além de agregar valor à matéria prima. Além disso, há um crescente interesse quanto à utilização de ingredientes naturais na produção de alimentos em resposta a inquietações concernentes ao uso de aditivos sintéticos devido aos seus efeitos toxicológicos ao consumidor. Portanto, as espécies *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) se revelam como importantes promissores para indústria alimentícia, pois além de apresentarem propriedades aromáticas estes possuem efeito antimicrobiano e antioxidante, os quais são cruciais para a aceitabilidade e conservação dos alimentos.

**Palavras-chave:** Segurança alimentar. Conservas. Moluscos bivalves.

## **ABSTRACT**

### **The risk of oyster consumption and use of the marination technique associated with extracts of medicinal plants in microbiological control: a review**

The oyster is an invertebrate animal that belongs to the Mollusca phylum from the class Bivalvia. Due to their filtration capacity and bioaccumulation, oysters can concentrate on their tissues a high load of pathogenic microorganisms present in the culture waters or in natural banks. Thus, although it is considered an excellent source of food, the consumption of oysters “in natura” offers risks to humans proving to be a powerful vehicle for diseases. One of the post-capture treatment methods that aims to ensure sanitary control of these organisms is the marination process. This technique, in addition to increasing the fish consumption options, allows the improvement of the sensorial attributes, according to the composition of the brine used, with the increase in the commercial life of perishable foods. In this perspective, the use of compounds containing natural antimicrobials associated with the marination process aims to increase the efficiency of this technique allowing better microbiological control, besides adding value to the raw material. In addition, there is a growing interest in the use of natural ingredients in food production in response to concerns about the use of synthetic additives because of their toxicological effects on the consumer. Therefore, the species *Origanum vulgare* (Oregano) and *Thymus vulgaris* (Thyme) prove to be important promising for the food industry, because besides having aromatic properties they present an antimicrobial and antioxidant effect, which are crucial for the acceptability and conservation of food.

**Keywords:** Food safety. Preserves. Bivalve molluscs.

## **1. Aspectos da produção de moluscos bivalves**

O nome ostra é aplicado a uma variedade de espécies epibentônicas pertencentes ao filo Mollusca, classe Bivalvia. Cerca de 8.000 espécies estão incluídas na classe bivalvia, das quais aproximadamente 1.300 vivem em água doce e as demais são marinhas, sendo as ostras, mexilhões, vieiras e teredos as principais espécies inseridas (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

A pesca e a aquicultura são setores que vêm ganhando destaque no cenário mundial, principalmente como produtores de alimentos. Na perspectiva econômica e de subsistência, estes setores vêm exercendo um grande papel social, sendo responsáveis por gerar emprego a milhares de pessoas (FAO, 2016).

Nesse contexto, a produção de moluscos bivalves vem crescendo no Brasil. Na região Nordeste do país a sua extração ocorre em áreas estuarinas e manguezais, os quais possuem um importante significado para as populações ribeirinhas, devido à sua alta produtividade e importância econômica (BERNARDO; MACIEL; SILVA, 2009).

Na aquicultura, o cultivo de ostras se destaca por apresentar baixo custo de produção, uma vez que o processo de alimentação ocorre naturalmente por meio da filtração da água para retenção de microalgas, promovendo maior viabilidade econômica quando comparada com espécies que requerem a utilização de rações comerciais (IGARASHI, 2009). Além disso, esses organismos apresentam alta fecundidade e rápido crescimento resultando em uma maior rentabilidade comercial (HERNANDEZ, 1998).

Em 2016, a produção aquícola mundial foi de 80,0 milhões de toneladas, gerando em torno de US\$ 232 bilhões. A produção de moluscos atingiu 16,9 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor mundial (FAO, 2018).

Na América Latina o Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves, com o Estado de Santa Catarina sendo o principal produtor do país, mesmo após uma queda de 4,6% na produção, foi responsável por 98,1% da produção nacional em 2015 (IBGE, 2016).



O Brasil é um país que possui condições naturais que favorece o desenvolvimento da aquicultura em todo o seu território, pois além de água em abundância (mais de 12% da água doce do planeta e uma costa marítima de aproximadamente 8,5 mil quilômetros com grande biodiversidade), o país apresenta um clima e geografia favoráveis e diversificados (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015). Esses parâmetros ecológicos são altamente favoráveis nas regiões costeiras e estuarinas da região do Nordeste, pois dispõem de temperaturas quentes ao longo do ano viabilizando a realização dos ciclos de cultivo (PEREIRA et al., 2007).

As duas espécies de ostras mais cultivadas no Brasil são *Crassostrea rhizophorae* mais conhecida como ostra de mangue e *Crassostrea gigas*, também conhecida como ostra do pacífico. A primeira vive nas águas de manguezais ou em regiões estuarinas, locais que apresentam águas com baixa salinidade, conhecidas como águas salobras e são cultivadas no litoral paulista, no Norte e Nordeste do Brasil. A segunda espécie, apesar de ser originária de lugares mais frios, se adaptou muito bem às águas frias do litoral do Sul do país (VALENTE, 2003; BRASIL, 2014).

## **2. Consumo de ostras: aspectos nutricionais e segurança alimentar**

Considerada uma proteína de origem animal mais saudável e consumida mundialmente, os brasileiros aderem cada vez mais ao pescado em sua rotina alimentar (BRASIL, 2014). No entanto, embora evidências atenuem os benefícios e a qualidade nutricional, bem como a sua importância na manutenção e recuperação da saúde, no Brasil a média do consumo de pescado “per capita” ainda se encontra abaixo (9,6 Kg) do valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde (12 Kg) (FAO, 2016).

O hábito do consumo de pescado varia de região para região, oscilando entre 21% no Norte e Nordeste, e 2% na região Sul do Brasil (GERMANO; GERMANO, 2008). Além disso, fatores econômicos, como por exemplo, o preço do pescado e a renda do consumidor, assim como aspectos culturais e sociais podem intervir diretamente no consumo (BRASIL, 2014).

Do ponto de vista dietético, os organismos marinhos, incluindo as ostras, são de fácil digestibilidade e se constituem uma importante fonte de proteína. Além

disso, as ostras apresentam um perfil equilibrado de aminoácidos, incluindo os aminoácidos essenciais, sendo os mais abundantes a lisina, leucina e isoleucina. Dentre o conjunto dos aminoácidos não essenciais, o ácido glutâmico, ácido aspártico e a glicina são os que mais se destacam (CACHOLA, 2008; GERMANO; GERMANO, 2008).

As ostras também são consideradas excelente fonte de vitaminas e minerais e ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3, os quais exercem grande importância para a alimentação humana, principalmente na prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis e na modulação do sistema imunológico (CACHOLA, 2008; GERMANO; GERMANO, 2008; SOARES; GONÇALVES, 2012; VAZ et al., 2014).

Na Tabela 1 é apresentado a composição química para uma porção de 100g da parte edível, considerada como o conjunto do miolo e do líquido intervalar de ostras cruas (FRANCO, 2008).

**Tabela 1.** Informação nutricional da composição química de ostras cruas em uma porção de 100 g. Valor calórico: 81,0 kcal.

NUTRIENTES	QUANTIDADES
Carboidratos	5,90 g
Proteínas	9,80 g
Lipídeos	2,00 g
Colesterol	230 mg
Cálcio	56 mg
Sódio	165,8 mg
Fósforo	150 mg
Potássio	237,5 mg
Ferro	5,80 mg
Vitamina A (Retinol)	52 mcg
Vitamina B1 (Tiamina)	220 mcg
Vitamina B2 (Riboflavina)	220 mcg
Vitamina B3 (Niacina)	1,900 mg
Vitamina C (Ácido ascórbico)	3,0 mg

Fonte: adaptado de Franco (2008).

A percentagem dos principais constituintes, como os macronutrientes variam de espécie para espécie e podem ser influenciados por fatores intrínsecos, tais como, sexo, grau de maturação sexual e tamanho, e por fatores extrínsecos como salinidade e temperatura da água, tipo de alimentação e local de cultivo (RUIZ, et al., 1992; ABAD, et al., 1995; KARAKOLTSIDIS, et al., 1995; HYUN et al., 2001).

O ambiente marinho é reconhecido como uma importante fonte de recursos naturais devido à sua grande diversidade. Nesse contexto, a aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce no mundo e no Brasil (PEREIRA et al., 2007; SEBRAE, 2015). Em virtude dessa produtividade, o controle higiênico sanitário dos organismos marinhos se torna necessário para a comercialização de produtos com qualidade e segurança alimentar (PEREIRA et al., 2006).

De acordo com Nitzke et al., (2010), o termo “segurança alimentar” é utilizado tanto no sentido de “*food safety*”, significando alimento seguro e inócuo, quanto no sentido de “*food security*”, quando se trata de soberania alimentar e garantia de acesso a uma alimentação adequada.

Salienta-se que a microbiota da carne das ostras está diretamente relacionada ao local de cultivo ou extrativismo, que na maioria das vezes são ambientes onde a descarga de esgotos não tratados nos recursos hídricos, como rios e mar, são as causas poluidoras mais frequentes. Em virtude disso, a qualidade sanitária da água onde os animais são retirados e o posterior beneficiamento se constituem etapas chaves para a obtenção de um produto com boa qualidade microbiológica (JAY, 2005; PEREIRA et al., 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Além disso, as técnicas de manejo utilizadas durante a obtenção dos moluscos tem se mostrado uma importante fonte de contaminação, que vão desde o momento da captura, ainda nos bancos pesqueiros, até seu destino final, estendendo-se às inúmeras fases de processamento, armazenamento e transporte (GERMANO; GERMANO, 2008).

### **3. Consumo de ostras e surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA)**

Apesar de sua contribuição nutricional para a alimentação humana, o consumo de moluscos bivalves pode gerar sérios riscos à saúde, pois além de serem cultivados em áreas costeiras, as quais são mais susceptíveis à

contaminação por agentes químicos e biológicos, estes organismos se adaptam facilmente às diversas condições ambientais, podendo se desenvolver em águas bastante poluídas (HUSS et al., 2000; JAY, 2005).

Além disso, estes organismos absorvem e bioacumulam em seus tecidos diversos patógenos humanos, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos, presentes nas águas de cultivo (FRANCO; LANDGRAF, 2008, GERMANO; GERMANO, 2008). Dessa forma, o consumo de moluscos bivalves crus tem se mostrado um grande risco à saúde de consumidores, pelo fato de se encontrarem envolvidos em diversos casos de toxinfecções alimentares (PEREIRA et al, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Mundialmente a ocorrência de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) vem aumentando de modo significativo se revelando um dos problemas mais frequentes do mundo contemporâneo. As DVA são definidas como uma síndrome que geralmente é constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados, podendo ser ocasionada por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2010).

As DVA, podem se manifestar na forma de infecções, resultantes da ingestão de alimentos que contém microrganismos patogênicos vivos, ou intoxicações e toxinfecções alimentares, quando ocorre a ingestão de toxinas de bactérias ou fungos presentes no alimento. Os sintomas mais frequentes são manifestações digestivas, além de afecções extraintestinais em diferentes órgãos, como rins, fígado, sistema nervoso central, dentre outros (OPS, 2001; SANTOS,2010; BRASIL, 2010).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) indicaram 6.632 surtos de DVA no Brasil durante o período de 2007 a 2016, envolvendo 118.104 pessoas doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. De acordo com o relatório o consumo de pescado foi responsável por 0,8% dos surtos, embora do total de surtos ocorridos, tanto o agente etiológico foi desconhecido em 70,3% dos surtos como o veículo (alimento) em 66,8% dos surtos. Ainda de acordo com o relatório a maior parte dos surtos de DVA (90,5%) foram causados por bactérias patogênicas e/ou suas toxinas, predominando *Salmonella* spp. (7,5%), seguida por *Escherichia coli* (7,2%), *Staphylococcus aureus* (5,8%), *Bacillus cereus*

(2,6%), coliformes (1,8%) e outras bactérias com percentual menos expressivo (BRASIL, 2016).

Apesar da comprovada relação de várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados e do elevado número de internações hospitalares, pouco se conhece a respeito da real magnitude do problema, já que a maioria dos casos são subnotificados. Além disso, poucos estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre a ocorrência de surtos de DVA, agentes etiológicos mais comuns, alimentos frequentemente envolvidos, população de maior risco e fatores contribuintes, o que acaba contribuindo para a precariedade do sistema (BRASIL, 2010; SANTOS, 2010).

Em virtude disso, vários países da América Latina estão implantando sistemas nacionais de vigilância epidemiológica das DVA tendo em vista os limitados estudos sobre os agentes etiológicos, a forma como esses contaminam os alimentos, bem como as quantidades necessárias a serem ingeridas na alimentação para que possa se tornar um risco (BRASIL, 2010).

Os primeiros casos de surtos associados ao consumo de ostras foram descritos em 1816, na França, em um grupo de pessoas que consumiram ostras contaminadas com águas de esgotos não tratadas, resultando em febre tifoide (PASQUIER, 1816). O maior caso de surtos já reportado ocorreu em Xangai, na China, no ano de 1988, no qual 290 mil pessoas foram acometidas pelo vírus da hepatite A resultando em 47 mortes após a ingestão de mariscos (TANG et al., 1991).

No Brasil foram notificados mais de 150 casos de surtos de DVA associados ao consumo de moluscos contaminados com toxina *Diarrheic Shellfish Poisoning* (DSP) durante a ocorrência da maré vermelha, em janeiro de 2007 no estado de Santa Catarina. Os moluscos incriminados foram o mexilhão e ostras cultivados no referido estado. Por ser a primeira descrição de casos comprovados de DSP um plano de contingência foi posto em prática pela primeira vez no Brasil, segundo as normas do Comitê Nacional de Controle Sanitário de Moluscos Bivalves. Estes dados alarmaram as autoridades para um monitoramento das áreas de cultivo, principalmente por se tratar de uma toxina termorresistente, não sendo, portanto inativada pela cocção (PROENÇA et al., 2007).

### 3. Microrganismos patogênicos em moluscos bivalves

A microbiota dos tecidos dos moluscos está diretamente relacionada com o ambiente em que estes animais estão inseridos devido à sua capacidade filtradora (2 a 5 litros de água/hora). Estes podem ser responsáveis por veicular diversos microrganismos patogênicos para o homem, sendo a maior parte proveniente da contaminação ambiental (FELDHUSEN, 2000; GERMANO; GERMANO, 2008).

No caso particular da pesca marítima, a captura em águas costeiras oferece maiores riscos do que a realizada em alto mar, já que fatores como, salinidade, temperatura, bem como a distância entre o local de cultivo e áreas poluídas com material fecal exercem grande influência na carga microbiológica dos animais (FELDHUSEN, 2000; PEREIRA et al., 2007; GERMANO; GERMANO, 2008).

Os agentes etiológicos de doenças veiculadas pelo pescado são causados por elementos químicos, físicos e biológicos, sendo este último composto por vírus, parasitas e bactérias patogênicas. Estas últimas podem estar associadas ao ambiente aquático em que o pescado está inserido, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*, bactérias presentes como resultado de contaminação fecal humana e de animais de sangue quente, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênica, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e bactérias introduzidas durante o manuseio pós-captura ou processamento como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (FELDHUSEN, 2000, SANTOS, 2010),

De acordo com Teplitski et al. (2009) diversas bactérias patogênicas têm sido continuamente isoladas de moluscos comercializados crus, tais como *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Salmonella* entérica, *Aeromonas* spp. e *Plesiomona* spp. Ainda segundo os autores *V. parahaemolyticus* tem emergido como a maior causa de surtos de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves ao redor do mundo.

A Legislação brasileira estabelece limites máximos permitidos para alguns microrganismos em moluscos bivalves. Porém, como na maioria das vezes a presença de microrganismos não altera a aparência e o sabor do alimento, e estes se revelam um grande risco à população por serem patogênicos para o homem e não deteriorantes no alimento (HONDA et al., 2000; VIEIRA, 2004).

Dentre as normativas brasileiras que estabelecem parâmetros microbiológicos para a comercialização de moluscos bivalves, tem-se a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece limites máximos de até  $10^3$  UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positivo e ausência para *Salmonella* spp. em 25 g do alimento para moluscos bivalves in natura. Enquanto para coliformes a 45 °C/g foi determinado limites de  $5 \times 10$  NMP/g apenas para moluscos coccionados, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados (BRASIL, 2001).

Já o Ministério do Meio Ambiente por meio da Resolução RDC nº 357 de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) adotou a denominação “coliformes termotolerantes”. De acordo com esta resolução, a média geométrica de coliformes termotolerantes (CT) para águas destinadas à proteção das comunidades aquáticas, à aquicultura, bem como para as atividades de pescas (Classe 1), não devem exceder 43 por 100 mililitros e o percentual de 90% não deverá ultrapassar 88 CT por 100 mililitros (em 15 amostras coletadas, no mínimo, no mesmo local) para o cultivo de moluscos bivalves (CONAMA, 2005).

Até o início de 2012 não existia no Brasil uma legislação específica para o controle higiênico sanitário de moluscos bivalves (SOUZA et al., 2014). Em 8 de maio de 2012 foi publicada a Instrução Normativa Interministerial nº 7, do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (BRASIL, 2012).

Esta normativa teve por objetivo estabelecer os requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como atuar no monitoramento e fiscalização ao atendimento destes requisitos, abrangendo as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte (BRASIL, 2012).

De acordo com o PNCMB em áreas de cultivo de moluscos bivalves, as amostras retiradas devem apresentar limites de até 230 NPM de *E. coli* por 100 g de carne e líquido intervalvar para serem comercializados diretamente para o consumo humano. Já os moluscos oriundos de área definida como “Liberada sob condição”, são estipulados resultados de até 46.000 NMP de *E. coli* por 100 g, sendo que estes podem ter sua carga microbiana reduzida por meio de

tratamentos pós-captura, como depuração em ambiente controlado ou tratamento térmico (BRASIL, 2013).

#### **4. Processo de marinação**

O marinado é uma das formas de preservação e conservação do pescado por meio de uma salmoura ácida. Este processo é uma das mais remotas formas de tratamento de alimentos surgido antes do século VII a.C., sendo hoje, um produto consumido não somente no Brasil, mas também em alguns países europeus (GONÇALVES, 2011).

Desde quando o homem tomou conhecimento a cerca da existência e da importância dos microrganismos nos alimentos, diversas mudanças vêm ocorrendo no campo da tecnologia, higiene e segurança alimentar, a fim de adequá-los às necessidades da sociedade contemporânea (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os problemas relacionados às doença veiculadas pelos alimentos ficou evidenciado principalmente com o advento da tecnologia, a qual possibilitou o surgimento dos alimentos preparados. Estes quando não são conservados e armazenados de maneira adequada são rapidamente deteriorados devido a ação de microrganismos que podem representar um risco à saúde dos consumidores (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nessa perspectiva, os produtos marinados além de conferirem maior tempo de conservação e agregação de valor a diversas matérias primas, como por exemplo, peixes, carne bovina, aves e moluscos, se apresentam como uma alternativa tecnológica de produtos semi-preparados e com características sensoriais desejáveis ao consumidor (PORTO, et al., 2000; BURKE; MOHANAN, 2003).

A marinação, expressão originária de línguas latinas, se refere à técnica de embeber carnes em salmouras, sendo esta classificada como semiconserva, em que sua preservação se dá através da combinação de ácidos orgânicos naturais, sal e condimentos à carne. O emprego da substância ácida nesta técnica, além de conferir o amaciamento da carne, estes alteram o sabor, textura, bem como suas propriedades estruturais, que são provenientes da ativação das catepsinas



musculares, resultando na degradação de algumas proteínas musculares em peptídeos e aminoácidos (GONÇALVES, 2011).

O processo de marinação tradicional e artesanal consiste na imersão da carne em salmoura, deixando-a macerar por algumas horas. No entanto, na indústria alimentícia seja em pequena ou grande escala, os alimentos podem ser marinados a partir de três métodos: imersão, injeção e massageamento (tumbleamento). Os métodos empregados além dos ingredientes utilizados nesses processos influenciam diretamente na qualidade do produto final (XARGAYÓ et al., 2007).

A técnica de submergir a carne na solução de marinação, provavelmente seja a mais antiga. A imersão é um método estático na qual os ingredientes penetram gradativamente por difusão, sem que haja aplicação de força durante o processo. Assim, os constituintes presentes na salmoura migram para o interior das miofibrilas, dependendo tão somente da concentração de sólidos e o tempo de imersão da carne (XARGAYÓ et al., 2007). Este método é indicado na produção de pequenos lotes à medida que apresentam baixo custo e simplicidade na sua execução. Além disso, esta técnica é a mais indicada para pescado, pois trata-se de um alimento que apresenta pouca resistência em sua estrutura corpórea quando comparado com outras carnes de origem animal (XARGAYÓ et al., 2007).

Na marinação realizada por injeção se utiliza uma injetora de salmoura, a qual permite perfurar a carne adicionando a quantidade exata de salmoura diretamente no tecido muscular. Para esta técnica, diversos fatores contribuem para a uniformidade do produto final, tais como: o tipo e a distância entre as agulhas, a velocidade de injeção, bem como a distância da esteira programada para a descida das agulhas e a forma com que ocorre a penetração destas. No entanto, para maior êxito no procedimento é desejável que a solução de trabalho esteja entre as temperaturas de 0 e 5°C para propiciar maior segurança e uma melhor retenção do líquido pelo produto (PRÄNDL et al., 1994; OLIVO, 2006).

Já no método de tumbleamento ocorre o massageamento da carne em salmoura em um equipamento que contém um recipiente cilíndrico, chamado *tumble*. Nesta operação os filamentos dos músculos são abertos permitindo a

absorção da salmoura por meio da aplicação da energia cinética. Além disso, para uma maior padronização e eficiência no processamento, este método permite controlar a temperatura, o vácuo e a fixação da velocidade de rotação, bem como o regime do processo, permitindo a agregação da solução na carne em poucos minutos. Dessa forma, no massageamento, a coesão, o rendimento e a maciez do produto final, além da distribuição da solução de marinação é realizada de forma rápida e uniforme (XARGAYO, et al., 2004; LEMOS, 2005; XIONG, 2005, OLIVO, 2006).

Além desses métodos, a marinagem pode ser executada por diferentes maneiras, as quais as mais utilizadas são: (I) marinação a frio, que consiste na imersão do alimento em meio ácido, sem nenhum tratamento térmico prévio; (II) marinação a quente, no qual o alimento é cozido diretamente na solução de marinação. Nesse caso, como produtos cozidos tendem a se oxidar (ranço) mais facilmente, somente pescado de melhor qualidade é adequado para a preparação desse tipo de marinado; (III) marinação fritos, que consiste no acondicionamento da matéria prima frita em meio ácido e após o resfriamento são imersos em uma solução contendo ácido acético, sal e aromatizantes, e (IV) marinação em gel, onde o produto é imerso em meio ácido para ser em seguida acondicionado em um gel (KNOCKAËRT, 1989).

### **5.1 Função dos ingredientes na estabilidade dos produtos marinados**

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde por meio da portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997 que aprova o Regulamento Técnico de Aditivos Alimentares, tem-se por definição que ingrediente “é qualquer substância, incluídos os aditivos alimentares, empregada na fabricação ou preparação de um alimento e que permanece no produto final, ainda que na forma modificada” (BRASIL, 1997).

Os marinados são semiconservas preservadas pela combinação de compostos ácidos, como por exemplo, ácido acético, cítrico, málico, suco de frutas cítricas, vinhos, além de sal (NaCl), especiarias e outros ingredientes em contato direto com a matéria prima, propiciando uma extensa, porém limitada, vida de prateleira. Embora a estabilidade do produto seja proporcionada pela adição desses ingredientes é de extrema importância que estes promovam ao

marinado boa aceitabilidade sensorial (POLLONIO, 2002; YASHODA, et al., 2005; GONÇALVES, 2011).

Os ácidos orgânicos utilizados na marinação são considerados acidulantes eficazes na diminuição do pH (4,0 – 4,5). Estas condições favorecem a atividade das catepsinas musculares tornando-as mais ativas e conseqüentemente a sua hidrólise e a entrada de solutos na carne. Esse processo irá conferir ao produto textura e aroma característico (GONÇALVES, 2011).

Além disso, a preservação ácida possibilita o decréscimo do pH e o aumento da força iônica, tornando o meio desfavorável ao crescimento de muitas espécies bacterianas. A legislação brasileira estabelece o limite de pH de até 4,5, visto que nesta faixa de pH ocorre a inibição de esporos de *C. botulinum* (QUAST et al., 2010).

A estabilidade de marinados de vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) durante 240 dias a temperatura ambiente foi estudada por Bispo et al. (2004). Segundo os autores a acidificação do produto (pH 4,5) com vinagre de vinho branco e o emprego de tratamento térmico durante 30 minutos possibilitou a estabilidade do produto sob o ponto de vista microbiológico, físico-químico, químico e sensorial.

Freitas e Oliveira-Filho (2016) também avaliaram o rendimento e a estabilidade do pH em marinados de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*) submetidos a 7°C. Os marinados foram submetidos a diferentes concentrações de ácido acético (55, 65 e 75%) por 48 horas e em seguida substituídos por óleo comestível. Para os autores a substituição do ácido acético pela solução de óleo comestível nos marinados não variou entre os tratamentos, porém a concentração mínima de 65% de ácido acético foi imprescindível para uma melhor estabilidade do pH, boa aceitação sensorial e rendimento do produto.

Os fosfatos alcalinos, aditivos utilizados na indústria de alimentos, também apresentam uma importante ação durante a marinação. Estes compostos atuam na retenção de água durante o processamento dos produtos por meio do aumento do pH e do desdobramento das proteínas musculares. Além disso, eles podem favorecer no aumento da suculência, pela redução da força de cisalhamento, retardam a descoloração e evitam a oxidação das gorduras devido sua ação

sequestrante de metais, melhorando as características sensoriais do produto (DUŠEK, et al., 2003; SHEARD; TALI 2004; VIANA, 2005; XU, et al., 2009).

A degradação do marinado envolve a tolerância tanto do ácido acético e dos fosfatos quanto do sal (NaCl). Além de restringir a disponibilidade de água do produto, o sal (NaCl) possui a capacidade de solubilizar as proteínas miofibrilares, contribuindo para a conservação da carne, pois retarda a ação de algumas bactérias e enzimas. Além disso, este é responsável por alterar os atributos sensoriais, tais como, o sabor, a textura e as propriedades estruturais da matéria prima, contribuindo para a aceitação comercial do marinado (ROCHA-GARCIA, 2003; GONÇALVES, 2011).

Outros ingredientes comumente utilizados nas formulações de marinados são os extensores (proteínas da soja e do soro do leite), açúcares, gomas, aromatizantes, ervas e especiarias. Todos estes atuam nas características sensoriais dos produtos, além de contribuírem para a sua estabilidade (OLIVO, 2006; DAGUER; ASSIS; BERSOT, 2010; GONÇALVES, 2011).

No entanto, devido à restrição dos antioxidantes sintéticos, bem como de alguns aditivos, a indústria tem investido em produtos de origem vegetal que apresentem boa eficiência sobre os produtos cárneos. Dessa forma, se destaca o uso das ervas, especiarias e óleos essenciais como sendo uma alternativa com enfoque nas características sensoriais e nos benefícios do produto à saúde, devido as novas tendências do consumidor por alimentos mais saudáveis e seguros (BORBA, 2012; BASIRI et al., 2015; HAUTE et al., 2016).

## **6.Compostos bioativos: uma alternativa à indústria de alimentos**

A busca por substâncias bioativas produzidas por diversas espécies vegetais tem sido incentivada e intensificada, uma vez que a extração de substâncias fitoquímicas apresenta grande potencial industrial e farmacológico (CARTAXO; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2010).

Na indústria alimentícia os agentes antimicrobianos naturais oferecem diversas vantagens para o processamento de alimentos, pois muitos atuam na inativação enzimática dos microrganismos, auxiliando na segurança e no aumento

da vida comercial de alimentos perecíveis (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

A exploração de compostos bioativos se constitui um grande potencial para o setor alimentício, já que no Brasil dados da Secretaria de Vigilância em Saúde apontaram cerca de 7.170 surtos de doenças veiculadas por alimentos durante o período de 2007 a 2017 (BRASIL, 2017).

Outra vertente para a utilização destes compostos vegetais consiste na sua aplicação como antioxidantes naturais em alimentos, uma vez que a oxidação lipídica se constitui um fator de grande importância para a sua deterioração (ARAÚJO, 2008; AMENSOUR et al., 2010).

Embora os antioxidantes sintéticos, como por exemplo, BHA (butil hidroxianisol) e BHT (butil hidroxitolueno) ofereçam resultados positivos no tocante a estas questões, pesquisas tem se voltado no intuito de encontrar produtos naturais que contenham compostos bioativos capazes de exercer tais funções, devido aos possíveis problemas e ações carcinogênicas resultantes do excessivo e prolongado consumo dessas substâncias sintéticas (SOUSA et al., 2007; LUNA et al., 2010)

Sabe-se que as substâncias biologicamente ativas geradas pelas plantas são resultantes de um conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em cada célula do vegetal, denominadas metabólitos, os quais são divididos em primários e secundários (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos primários são considerados essenciais às funções básicas e intracelulares, sendo responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas (DEWICK, 2002; SIMÕES et al., 2007). Clorofila, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas, são exemplos comuns de substâncias envolvidas nesse processo (BOPPRÉ, 1984).

Já os produtos resultantes do metabolismo secundário desempenham funções cruciais que permitem a interação do organismo e o ambiente, garantindo vantagens que contribuem para a sobrevivência e a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (KUTCHAN, 1995; SIMÕES et al., 2007).

Embora o processo divisor entre o metabolismo primário e secundário não esteja totalmente esclarecido, acredita-se que mesmo classificadas como primária ou secundária, as reações bioquímicas envolvidas nestes processos não ocorrem de maneira independente em um mesmo produtor (SIMÕES et al., 2007).

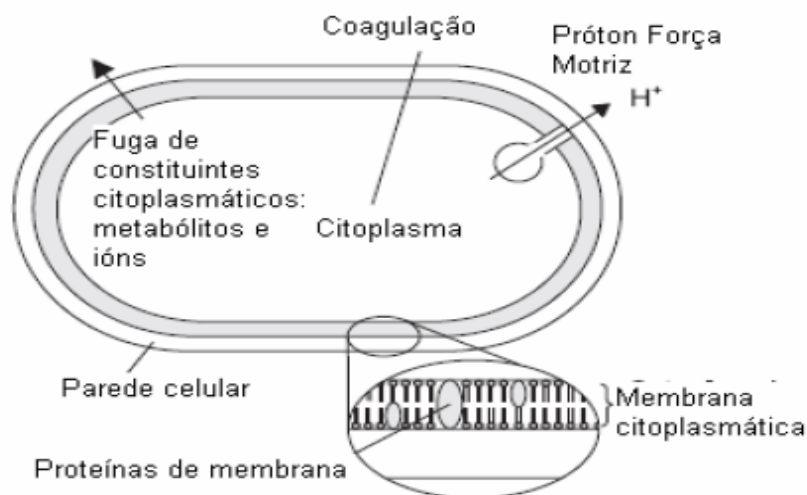
De acordo com Cowan (1999) as substâncias resultantes do metabolismo secundário, atuam em alguns processos adaptativos, servindo como mecanismo de defesa do próprio vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos. Além disso, alguns destes compostos são responsáveis por fornecer odor, pigmentação e sabor às plantas.

Os principais grupos de compostos extraídos dos vegetais são: lectina, terpenóides, alcalóides, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides) taninos e cumarinas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; HAIDA et al., 2007). Porém, a quantidade e/ou disponibilidade destes compostos podem ser influenciados por variações climáticas, que podem repercutir diretamente sobre a sua atividade biológica (NASCIMENTO et al., 2008).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2006) outros aspectos tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, são exemplos de fatores que influenciam diretamente no conteúdo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas.

Em relação as suas propriedades antimicrobianas, tais compostos podem atuar e desestabilizar diversos sistemas nos microrganismos, podendo gerar a desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo, coagulação do conteúdo da célula (BURT, 2004).

Além disso, os produtos gerados por estas espécies podem atuar no metabolismo intermediário dos microrganismos ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio e interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal (LIMA, 2001). Na Figura 1 estão ilustrados os locais, ou estruturas, da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os compostos extraídos das plantas (BURT, 2004).



**Figura 1.** Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana. Fonte: Adaptado de Burt (2004).

Diversos estudos têm sido realizados a partir da extração de substâncias ativas dos extratos de diversas plantas para rastreamento da atividade antimicrobiana (KUMAR et al., 2010; RAHMAN et al., 2011; DELGADO-ADAMÉZ et al., 2012; SANTOS et al., 2015).

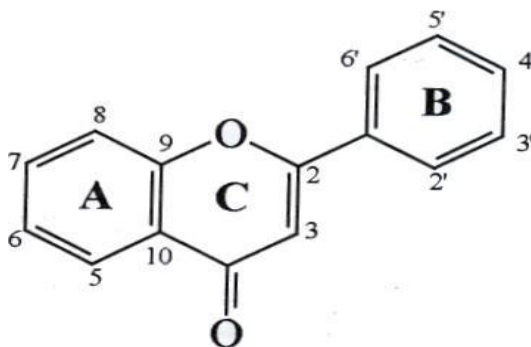
Rahman et al. (2011), descreveram que os produtos naturais (óleos e extratos) derivados de *Premna integrifolia* Linn. apresentaram um grande potencial de atividade antibacteriana contra *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella pneumoniae* e *Xanthomonas campestris*. Além disso, os autores concluíram que os compostos químicos obtidos a partir das espécies vegetais podem apresentar grande potencial para uso em indústrias alimentares, farmacêuticas e/ou agroindustriais para conservantes ou agentes antimicrobianos.

De acordo com a sua biossíntese, os metabólitos secundários oriundos dos produtos naturais podem ser divididos em três grandes grupos: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Este último apresenta grande importância para a atividade antioxidante de extratos vegetais por possuírem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados ao anel aromático, além de instaurações e elétrons disponíveis a serem doados (SIMÕES, 2007).

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos das plantas. Cerca de 8.000 constituintes já foram identificados, sejam moléculas simples ou

complexas. Baseado em sua estrutura química, os compostos fenólicos podem ser classificados em: fenóis simples e benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas e ácidos fenilacéticos, fenilpropanóides, naftoquinonas, xantonas, estilbenos e antraquinonas, flavonoides e isoflavonóides, lignanas, diflavonóides, melaninas vegetais, ligninas e taninos hidrolisáveis e condensados (BRAVO, 1998; SIMÕES, 2007).

No entanto, a classe fenólica mais importante e diversificada são os flavonoides com mais de 4.200 compostos descritos. Em relação a sua estrutura (Figura 2), basicamente é comum que todos os flavonoides sejam constituídos por três anéis, sendo que a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (SIMÕES, 2007).



**Figura 2.** Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração. Fonte: Simões, (2007).

Dentre as principais funções atribuídas aos flavonoides, as que mais se destacam são: proteção nos vegetais contra a incidência de raios ultravioletas e contra insetos e microrganismos; atração para que as plantas se tornem mais visíveis à polinização; antioxidante; aleopática, além de possuírem propriedades terapêutica e biológicas (SIMÕES, 2007).

### **6.1 Família Lamiaceae: caracterização geral**

A família Lamiaceae possui diversas espécies de plantas de importante interesse econômico, medicinal e industrial. Plantas desta família pertencem à ordem Tubiflorae Lamiales e atualmente inclui cerca de 200 gêneros e 3.200 espécies (LORENZI; MATOS, 2002). Embora estejam presentes em diversas



regiões do mundo, seu maior centro de dispersão se encontra em regiões Mediterrâneas (BARROSO, 2002).

As plantas da família Lamiaceae possuem diversas características morfológicas, podendo se apresentar como árvore, arbusto ou ervas. Suas folhas são simples ou, raramente, compostas, opostas ou verticiladas e sem estípulas, geralmente serradas. Possuem como principal característica o marcante aroma e a sua utilização comercial é bastante relevante dado que muitas espécies são usadas como condimentos, para extração de óleos, extratos e chás, e como plantas ornamentais e paisagísticas. Dentre algumas espécies encontradas no Brasil o *Origanum vulgare* L. (orégano) e o *Thymus vulgaris* L. (tomilho) estão entre as que mais se destacam, as quais desde os tempos remotos são utilizadas para fins medicinais e nutricionais (LORENZI; MATOS, 2002).

#### 6.1.1 Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)

*Thymus vulgaris* L. (tomilho) é uma planta medicinal, aromática e condimentar, amplamente cultivado em diversas regiões do mundo (VANACLOCHA; CAÑIGUERAL, 2003). Caracterizado como um subarbusto perene, ereto, ramificado, chegando a medir de 20 a 30 cm de altura e em seus ramos observa-se uma cobertura leve de pelos brancos, com folhas simples e pequenas de coloração verde escura e formato oval (Figura 3) (NABAVI et al., 2015).



**Figura 3:** Prancha botânica de *Thymus vulgaris* L. (Fonte: Botanical.com – A Modern Herbal).

A espécie *Thymus vulgaris* é a mais conhecida do gênero e suas infusões, decocções, extratos ou óleos essenciais apresentam diversos benefícios à saúde em virtude de suas propriedades antiespasmódica, expectorante, imunoestimulante, mucolítica, broncodilatadora e digestiva (VANACLOCHA; CAÑIGUERAL, 2003). Também são encontrados relatos de suas propriedades antioxidante e antimicrobiana, devido à presença de seus constituintes (KULISIC; RADONIC; MILOS, 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2010; IMELOUANE et al., 2009; KON; RAI, 2012; NABAVI et al., 2015).

O estudo de Martins et al. (2015) permitiu aos autores concluir que a decocção, infusão e extrato hidroalcoólico de tomilho apresentaram potencial antioxidante e atividade biológica, utilizando o método de disco difusão, frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus aerogenes*, *Proteus vulgares* e *Enterobacter sakazakii*), com a decocção apresentando o efeito mais pronunciado. Os autores atribuíram tais atividades às concentrações de compostos fenólicos (ou ácidos fenólicos ou flavonoides) encontradas nas preparações estudadas.

Resultados da atividade antioxidante semelhantes a estes foram encontrados nos estudos de Roby et al. (2013) em extratos metanólicos de tomilho. Dentre os principais constituintes encontrados, o ácido cinâmico (28%) foi o composto fenólico que mais se destacou, seguido dos dois flavonoides principais: apigenina (8%) e luteolina-7-*o*-rutinose (7%). Também foram encontrados teores do ácido carnósico (7,5%), o ácido rosmarênico (7,3%) e o metilmarmarenato (6%).

### **6.1.2 Orégano (*Origanum vulgare* L.)**

*Origanum vulgare* L. (orégano) é uma planta aromática, herbácea e muito resistente que possui grande importância no ramo alimentício, na qual é utilizada como especiarias em diversas regiões do mundo. Cultura perene de cerca de 30 a 60 cm, possui botões amadeirados os quais se ramificam no topo da planta e contêm densos cachos de minúsculas flores brancas ou cor-de-rosa (Figura 4) (GARCÍA; SOLÍS, 2015).



**Figura 4:** Prancha botânica de *Origanum vulgare* L. (Fonte: Botanical.com – A Modern Herbal).

Seja na forma de chás ou tinturas o orégano é bastante utilizado na medicina tradicional contra o frio, distúrbios respiratórios e digestivos, além de possuir efeitos expectorante, antisséptico e antiespasmódicos (IVANOVA et al., 2005; VANACLOCHA; CAÑIGUERAL, 2003). Além disso, óleos essenciais, infusões e extratos vem sendo estudados devido as suas atividades biológicas (CHAUDHRY; TARIQ, 2007; SAEED; TARIQ, 2009) e antioxidantes (BARROS et al., 2010 ; QUIROGA et al., 2013).

Extratos hidroalcolícos e aquosos (preparações de decocção e infusão) de orégano foram estudados por Martins et al. (2014) e comprovados a sua eficácia tanto contra bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas, principalmente *E. coli* e *P. aeruginosa*. Além disso, ambos extratos possuíram atividade antioxidante, a qual foi relacionada com os compostos fenólicos, principalmente flavonoides, detectados e identificados na presente pesquisa.

Extratos de hexano e óleos essenciais de orégano também obtiveram atividade biológica comprovada pela técnica de microdiluição em caldo, apresentando efeito mais pronunciado contra o *Mycobacterium smegmatis*, atingindo MIC = 25 µg mL<sup>-1</sup>. Neste estudo, em ambas extrações, o principal constituinte encontrado foi o 1-hexacosanol não esterificado, C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>O, acumulado principalmente em brácteas e flores. Para os autores estes extratos

podem ser utilizados em alimentos visando a sua prevenção de deterioração oriundas do crescimento de microrganismos (CASTILHO et al., 2012).

Apesar do expressivo número de trabalhos que avaliam a utilização de produtos naturais em alimentos e que evidenciam atividades bioativas para as espécies *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*, ainda são escassos relatos na literatura sobre a utilização destes como alternativa antimicrobiana e antioxidante natural em marinado de ostras.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. et al. Seasonal variations of lipids classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 110, n. 2, p.109-118, 1995.
- AMENSOUR, M. et al. Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de myrtus. **Cyta - Journal Of Food**. Reynosa, p. 95-101. ago. 2010.
- ANTUNES, R M P et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p.517-524. 2006.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos - Teoria e Prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- BARNES, R.S.K. et al. **Os invertebrados: Uma síntese**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.
- BARROS, L. et al. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. **LWT - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.544-550, abr. 2010.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 2002.
- BASIRI, S. et al. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. **Lebensmittel-wissenschaft & Technologie: Food Science and Technology**, Iran, v. 60, n. 1, p.1025-1033, jan. 2015.
- BERNARDO, S.J.; MACIEL, M.I.S.; SILVA, A.P.G. Avaliação dos aspectos higiênico-sanitários no processamento de moluscos na comunidade de pescadores (as) artesanais da Ilha de Deus, Recife – PE. In: XX Congresso Brasileiro de Economia Doméstica. 2009, Fortaleza. **Anais...** UFC, Fortaleza - CE, 2009.
- BISPO, E.S. et al. Processamento, estabilidade e aceitabilidade de marinado de vongole (*Anomalocardia brasiliiana*). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 24, p.353-356, set. 2004.
- BOPPRÉ, M. Rbiedefining “pharmacophagy”. **Journal of Chemical Ecology**, v.10, n.7, p. 1151- 51, 1984.
- BORBA, H., et al. Características físico-química e sensoriais de embutido fresco de aves de descarte preparado com diferentes antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador-BA, v.13, nº 2, p. 360-370, abr./jun., 2012.

BRASIL . Associação Cultural e Educacional Brasil – Aceb: **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. v. 1, 15 jan. 2014. Disponível em: <[http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520\\_218117.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL . Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Pesca quer quadruplicar produção aquícola no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/ministerio-da-pesca-quer-quadruplicar-producao-aquicola-no-brasil>>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF. 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura. Departamento de Monitoramento e Controle, Coordenação-geral de Sanidade Pesqueira. **Manual do MPA para o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves-PNCMB**. Brasília. v. 1, 2012. Cgsap/democ/semoc/mpa. Disponível em: <[http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/files/2012/09/Manual-do-MPA-para-o-PNCMB-\\_versão-final-25.04.2013\\_LB.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/files/2012/09/Manual-do-MPA-para-o-PNCMB-_versão-final-25.04.2013_LB.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2016. 19 slides, color. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Portaria Nº 540, de 28 de outubro de 1997. **Regulamento Técnico de Aditivos – definições, classificação e emprego**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm>. Acesso em: 15 set. 2018.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p. 317-38, 1998.

BURKE, R.M.; MONAHAN, F.J. The tenderization of shin beef using a citrus juice marinade. **Meat Science**.v. 65, p. 161-168, 2003.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, 223-253, 2004.

CACHOLA, R. ; SILVA, H.A.. Depuração dos Molusco Bivalves. In: SILVA, Helena A.; BATISTA, Irineu (Ed.). **Publicações Avulsas do IMIPAR: Produção, Salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal**. 20. ed. Portugal: Imipar, 2008. Cap. 8, p. 176.

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA, S. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CASTILHO, P. C. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.552-558, fev. 2012.

CATÃO, R M R et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p.9-14. 2010.

CHAUDHRY, N. M. A.; TARIQ, S.; PERWEEN.T. Antibacterial effects of oregano (*origanum vulgare*) against Gram negative bacilli. **Pakistan Journal Of Botany**, Pakistan, v. 39, n. 2, p.609-613, 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução N°357 de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a qualidade dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes e dá outras providências**. D.O.U., Brasília, DF. 2005.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

CROTEAU, R; KUTCHAN, T. M; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B; Gruissem, W; Jones R (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier Companies, Inc., 2000. p. 1250-318.

DAGUER, H.; ASSIS, M. T. Q. M.; BERSOT, L. S. Controle da utilização de ingredientes não cárneos para injeção e marinação de carnes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p.2037-2046, set. 2010.

DELGADO-ADÁMEZ, J. et al. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. **Food And Chemical Toxicology**. Kk, p. 2481-2486. fev. 2012.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. London: John Wiley & Sons, 2002.

DUSEK, M.; KVASNICKA, F.; LUKASKOVA, L.; KRATKA, J. Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products. **Meat Science**. v.65, n.2, p.765-769, 2003.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture, 2018**. Electronic Publishing Policy and Support Branch, Roma, 2018. Disponível em < <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf> >. Acesso em 30 de dez. 2018.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborn disease. **Microbes and Infections**, Paris, v.2, p. 1651-1660, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FREITAS, M. M; OLIVEIRA-FILHO, P. R. C. Estabilidade e aceitação sensorial de marinados de camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*). **Acta Of Fisheries And Aquatic Resources**, Sergipe, v. 2, n. 4, p.44-49. 2016.

GARCÍA, E. C.; SOLÍS, I. M. **Manual de Fitoterapia**. 2. ed. Espanha: Elsevier, 2015. 1626 p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-81, 2007.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado**: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011.

HERNÁNDEZ, O.D.; TROCCOLI, L.G; MILLIÁN, Y.J.Q. Crecimiento, engorde y sobrevivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1928 em la Islã de Cubagua, Venezuela. **Caribbean Journal of Science**, v. 34, n. 3-4, p.243-249, 1998.

HAIDA, K.S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HAUTE, V, S. et al. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. **Food Control**, Belgium, v. 68, p.30-39, mar. 2016.

HONDA , T.; YOH, M.; KONGM UANG, U.; MIWATANI, T. Enzyme Linked Immunosorbent assays for detection of Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of clinical Microbiology**, Washington. v .45, n.3, p.38.2000.



- HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 5, p.01-11, dez. 2013.
- HUSS, H.H.; REILLY, A. & EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v.11, p.149-156, 2000.
- HYUN, K. H. et al. The effect of food composition on Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) growth in Korea: a modeling study. **Aquaculture**. v. 199, n. 1-2, p.41-62, 2001.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. 43. ed. Brasil: Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão - Ibge, 2016. 47 p.
- IGARASHI, M. A. Potencial do cultivo das ostras do mangue. **Pubvet**, Londrina, v. 3, n. 1, jan. 2009.
- IMELOUANE, B et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. **International Journal Of Agriculture And Biology**. Morocco, p. 205-208. 2009.
- IVANOVA, D. et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 96, n. 1-2, p.145-150, Jan. 2005.
- JAY, J. M.. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KNOCKAËRT, C. **Les marinades des produits de La mer**. Collection (Valorisation des produits de la mer). Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer IFREMER, 1989.
- KARAKOLTSIDIS, P.A.; ZOTOS, A.; CONSTANTINIDES, S.M. Composition of commercially important mediterranean finfish, crustaceans and mollusks. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 8, n. 3, p. 258-273, 1995.
- KON, K; RAI, M. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. **Nusantara Bioscience**. p. 50-56. 2012.
- KULISIC, T; RADONIC, A; MILOS, M. Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. **Italian Journal Of Food Science**. Croatia, p. 315-324. 2005.
- KUMAR, G. et al. Antimicrobial Activity of Latex of *Calotropis Gigantea* Against Pathogenic Microorganisms: An In Vitro Study. **Pharmacologyonline**, p.155-163, dez. 2010.

KUTCHAN, TM. Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **The Plant Cell**, v.7, p. 1059-70, 1995.

LEMOS, A.L.S.C. Tecnologias disponíveis para realçar a maciez da carne bovina. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 3. São Pedro. Anais. São Pedro, 2005.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.  
LUNA, A.; LÁBAQUE, M.C.; ZYGADLO, J.A.; MARIN, R.H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370, 2010. DOI: 10.3382/ps.2009-00130.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos**. 2011. Embrapa Agroindústria Tropical.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIRO, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.

MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 167, p.131-137, jan. 2015.

MARTINS, Natália et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 158, p.73-80, set. 2014.

NABAVI, S. M. et al. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. **Food Chemistry**. v. 173, n. 1, p. 229-347, 2015.

NASCIMENTO, J.E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NITZKE, J. A. et al. Segurança alimentar: rompendo barreiras. **Brazilian Journal of Food Technology**, Brasil, p. 1-9. nov. 2010.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives: A mini-review. **Food Control**. p. 805-816. nov. 2011.

OLIVO, R. Tecnologia da extensão cárnea. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. São Paulo: Varela, p.175-184, 2006.

OPS. Guía veta: **guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias**. Buenos Aires: OPS, 2001.

PASQUIER J. Essai medicale sur les huitre. Paris Faculte de Medicina, Paris.1816.

PEREIRA, A. M. L. et al. **A criação de ostras para a aquicultura familiar**. Teresina - Pi: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Meio-norte, 2007. 16 p.

PEREIRA, M. A. et al. Microbiological quality of oysters (*crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Florianópolis, p. 159-163. fev. 2006.

POLLONIO, M.A.R. **Elaboração de carnes marinadas temperadas maturadas e pré-fatiadas em açougues**.1 ed. São Paulo, 2002.

PORTO, A.C.S.; TÔRRES, R.C.O.; ILHA, E.C.; LUIZ, M.T.B.; SANTANNA, E.S. Influência da composição da salmoura sobre os parâmetros físico-sensoriais e microbiológicos de filés de peito de frango marinados por imersão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v.18, p. 141-150, 2000.

PRÄNDL, O. et al. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854p.

PROENÇA L.A.O. et al. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Sub-tropical Southwest Atlantic. **Harmful algae news, IOC/ UNESCO**, v. 33, p.19-20, 2007.

QUAST, E. et al. Cinética de acidificação de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt.).**Brazilian Journal of Food Technology**., Campinas, v. 13, n. 4, p. 286-292, out./dez. 2010.

QUIROGA, P. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. **International Journal Of Food Science And Technology**. Argentina, p. 642-649. mar. 2013.

RAHMAN, A. et al. In vitro antibacterial properties of essential oil and organic extracts of *Premna integrifolia* Linn. **Arabian Journal of Chemistry**. p. 475-479. jun. 2011.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

ROBY, M. H. H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 43, p.827-831, maio 2013.

ROCHA-GARCIA, C. E., YOUSSEF, E. Y., SOUZA, N. E., MATSUCHITA, M., FIGUEIREDO, E., SHIMOKOMAKI, M.: Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. **Journal Applied. Poultry Research**, 2003.

RUPPERT; FOX; BARNES. **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005.

RUIZ, C.; ABAD, M.; SEDANO, F.; GARCIA-MARTIN, L.O. & SÁNCHEZ LÓPEZ, J.L. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. V. 155, p. 249-262,1992.

SAEED, S; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. **Akistan Journal Of Pharmaceutical Sciences**. Pakistan, p. 421-424, 2009.

SANTOS, C. A. M. L. DOENÇAS TRANSMITIDAS POR PESCADO NO BRASIL. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p.234-241, dez. 2010.

SEBRAE. **AQUICULTURA NO BRASIL: Série de Estudos Mercadológicos**. Brasil: 2015.

SHEARD, P.R.; TALI, A. Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. **Meat Science**.v.68, n.2, p.305-311, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ufrgs Editora, 2007. 1104 p.

SOARES, K. M.P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p.1-10, 2012.

SOUZA, R.V. de; RUPP, G.S.; CAMPOS, C.J.A. de; LEE, R. **Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia**. Florianópolis: Epagri, 2014, 48p.

- TANG, Y. W et al. A serologically confirmed, case-control study, of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clams. **Epidemiology And Infection**, China, v. 107, n. 3, p.651-657, dez. 1991.
- TEPLITSKI, M.; WRIGHT, A. C; LORCA, G. Biological approaches for controlling shellfish: associated pathogens. **Current Opinion In Biotechnology**. United States, p. 185-190. abr. 2009.
- VANACLOCHA, B; CAÑIGUERAL, S. **Phytotherapy**: Prescription Vademecum. 4. ed. Barcelona: Masson, 2003. 1092 p.
- VALENTE, L. (Ed.). **Cultivo de Ostras**. 2. ed. Brasil: Bmlp, 2003. (Manuais de Maricultura).
- VAZ, D. S. S. et al. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista UNINGÁ Review**, Apucarana, v. 20, n. 2, p.48-54, dez. 2014.
- VIANA, A.G. Tecnologia de Marinados, glases e rubs. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, n. 335, p. 64-68, 2005.
- VIEIRA, F.S.H.R.; RODRIGES, P.D.; BARRETO, E.S.N.; SOUSA, V. ; TORRES, O. C .R.; SAMPAIO, S.S.; NASCIMENTO, M.M.S. **Microbiologia ,Higiene e Qualidade do Pescado** . São Paulo:2004,v. 1, Editora Varela, p. 89-130.
- VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour And Fragrance Journ.** Spain, p. 13-19. jan. 2010.
- XARGAYÓ, M.; LAGARES, J.; FERNÁNDEZ, E.; BORRELL, D.; JUNCÁ, G. Solution for improving meat texture. Influence of spray injection on the organoléptica and sensory characteristics. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 2, p. 68-74, 2004.
- XARGAYÓ, M., LAGARES, J., FERNÁNDEZ, E., BORREL, D., JUNCÁ, G.: **Uma solução definitiva para melhorar la textura de la carne**. Departamento de Tecnologia, Metalquimia S/A - Espanha, 2007.
- XIONG, Y.L. Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 281-287, 2005.
- XU, S.Q. et al. The influence of polyphosphate marination on Simmental beef shear value and ultrastructure. **Journal of Muscle Foods**, v.20, n.1, p.101-116, 2009.
- YASHODA K.P.; RAO R.J.; MAHENDRAKAR, N.S.; RAO D.N. Marination of sheep muscles under effect on meat texture quality. **Journal of Muscle Foods**. v.16, p. 184- 191, 2005.

---

## **CAPÍTULO 2**

**Marinados de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) associado aos extratos de orégano e tomilho: uma contribuição tecnológica**

Artigo a ser submetido à Revista Brazilian Journal of Food Technology

---

# MARINADOS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) ASSOCIADO AOS EXTRATOS DE ORÉGANO E TOMILHO: UMA CONTRIBUIÇÃO TECNOLÓGICA

Mariana Pereira Santana Real<sup>1</sup>, Norma Suely Evangelista\_Barreto<sup>1</sup>, Floricea Magalhães Araújo<sup>2</sup>, Thúlio Victor Santos Rocha<sup>1</sup>, André Dias de Azevedo Neto<sup>1</sup>, João Albany Costa<sup>1</sup>

1 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas UFRB (CCAAB), Cruz das Almas/BA - Brasil

2 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC), Cruz das Almas/BA - Brasil

## RESUMO

Objetivamos, com o trabalho, elaborar e avaliar a estabilidade microbiológica, físico-química e sensorial de marinados de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) associados aos extratos aquosos de orégano e tomilho. Inicialmente foram estudados as propriedades fitoquímicas e antimicrobianas dos extratos. Os tratamentos de marinados foram elaborados em duas etapas distintas, na primeira se empregou a tecnologia de obstáculos (Ácido acético + extrato de orégano ou extrato de tomilho + tratamento térmico) (3 tratamentos). Na segunda etapa se utilizou os ingredientes separadamente (5 tratamentos), armazenados sob refrigeração ( $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 120 dias e acompanhamento das características físico-químicas e sensoriais para melhor qualificação do produto final. Os extratos de orégano e tomilho apresentaram atividade antimicrobiana e antioxidante no estudo in vitro. Não houve crescimento bacteriano nos tratamentos nos quais foram empregados a tecnologia dos obstáculos. Já nos tratamentos em que os ingredientes foram testados separadamente, o que melhor serviu de barreira contra o crescimento de bactérias psicotróficas e *Staphylococcus aureus* foi o tratamento com ácido acético (AAC) devido ao baixo pH da salmoura. Os tratamentos com extrato de orégano (EOR) e com extrato de tomilho (ETO) foram equivalentes aos achados na atividade antimicrobiana in vitro, porém para as bactérias psicotróficas os achados não se mostraram eficientes. Sob os aspectos físico-químicos, com exceção dos teores de lipídeos, sódio e bases voláteis totais, percebeu-se redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos teores de carboidrato, proteína,

nitrogênio, fósforo, zinco, cálcio, potássio e umidade durante o armazenamento. O Índice de Aceitabilidade sensorial das formulações de marinados foi de 77,50 - 83,21%. Com base nos resultados apresentados o processo visa dar contribuição tecnológica no ramo alimentício e efeitos benéficos à saúde de consumidores sem que haja efeitos nocivos ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Especiarias. Conservas. Bactérias.

### **OYSTER MARINATES (*Crassostrea rhizophorae*) ASSOCIATED WITH ORÉGANO AND THYME EXTRACTS: A TECHNOLOGICAL CONTRIBUTION**

**ABSTRACT-** The objective of this work was to elaborate and evaluate the microbiological, physicochemical and sensorial stability of oyster marinades (*Crassostrea rhizophorae*) associated with aqueous extracts of oregano and thyme. At first, the phytochemical and antimicrobial properties of the extracts were studied. The treatments of marinades were elaborated in two distinct stages: in the first one, the obstacle technology was used (Acetic acid + extract of oregano or extract of thyme + heat treatment) (3 treatments). In the second stage, the ingredients were used separately (5 treatments), stored under refrigeration ( $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) for 120 days and followed the physical-chemical and sensorial characteristics to qualify the final product. The extracts of oregano and thyme presented antimicrobial and antioxidant activity in the “in vitro” study. There was no bacterial growth in the treatments in which obstacle technology was used. However, in the treatments where the ingredients were tested separately, the treatment with acetic acid (AAC) worked better as a barrier against the growth of psychotropic bacteria and *Staphylococcus aureus*, due to the low pH of the brine. The treatments with extracts of oregano (EOR) and thyme extract (ETO) were equivalent to the findings in “in vitro” antimicrobial activity, but for the psychotropic bacteria, the findings were not efficient. A significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) was observed in the carbohydrate, protein, nitrogen, phosphorus, zinc, calcium, potassium and moisture contents, during storage. The Sensory Acceptability Index of marinade formulations was 77.50 - 83.21%. Based on the results, the process aims to provide a technological contribution in the food sector and beneficial effects on the health of consumers without any harmful effects to the environment.

**Key-words:** Medicinal plants. Spice. Preserve. Bacteria.



## 1. INTRODUÇÃO

Os moluscos apresentam uma cadeia produtiva bastante limitada sob os aspectos higiênico-sanitários e de conservação, o que aumenta a necessidade de aperfeiçoamento e adoção de técnicas de processamento pós-captura (ALMEIDA FILHO et al., 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 2004). Em virtude disso, a indústria alimentícia vem buscando novas maneiras de agregar valor aos produtos cárneos, e um exemplo desse avanço é a técnica de marinação.

Além de prolongar a vida útil dos produtos cárneos, a marinação fornece ao consumidor um produto minimamente processado e agradável sob os aspectos sensoriais (RHOADES et al., 2013). Em formulações de marinados propostas por Yang et al.(2013) e Cho et al. (2016), tais qualidades foram proporcionadas à matéria prima utilizada, embora o crescimento de microrganismos nas formulações tenha contribuído em menor qualidade e prazo de validade dos produtos.

Um das alternativas frente a este problema visando o não uso de conservantes sintéticos, é a utilização de antimicrobianos naturais. Na indústria alimentícia os agentes antimicrobianos naturais oferecem diversas vantagens para o processamento de alimentos, pois muitos atuam na inativação enzimática dos microrganismos, auxiliando na segurança e no aumento da vida comercial de alimentos perecíveis (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011). Além disso, muitas pesquisas desenvolvidas neste ramo se baseiam em microrganismos responsáveis por grandes surtos epidemiológicos, tais como, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (BURT, 2004; ANTUNES et al., 2006; CATÃO et al., 2010).

Neste quesito, plantas e ervas aromáticas se apresentam como promissores antimicrobianos naturais. Além da segurança que estes compostos bioativos conferem aos alimentos, a influencia na qualidade nutritiva, química e sensorial desses compostos nos alimentos são de grande interesse para a indústria alimentícia. Outro aspecto importante que também deve ser levado em consideração é a substituição aos antioxidantes e antimicrobianos sintéticos a fim

de gerar menor efeito tóxico e indesejável nos seres humanos (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017; GIACOMETTI et al., 2018).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) e o tomilho (*Thymus vulgaris* L.), ambos da família Lamiacea são plantas amplamente utilizadas como ingredientes típicos, temperos e aromatizantes na culinária brasileira e além de ser facilmente cultivadas e não apresentarem toxicidade, estas espécies apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Todavia, estudos que associe a técnica de marinação com a utilização de extratos aquosos de orégano e tomilho ainda são limitados.

Embora o estudo da atividade antimicrobiana seja de extrema importância para averiguar a qualidade do alimento, é de grande valia pesquisas mais completas que trace o perfil químico e sensorial dos produtos gerados. Além disso, do ponto de vista nutricional a utilização de extratos de plantas nos alimentos se constitui um marco para a indústria moderna de alimentos que além de torna-los funcionais, ou seja, mais saudáveis (GIACOMETTI et al., 2018), estimula o interesse do consumidor e das indústrias em optarem por rotas não tóxicas e mais sustentáveis para sua produção.

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito dos extratos aquosos de orégano e tomilho em marinados de ostras sobre a população de microrganismos e verificar a sua influência nas qualidades químicas, funcionais e sensoriais do produto.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

As amostras vegetais de orégano (*Origanum vulgare* L.) (lote 060/17-0) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (lote Tlh-141016) foram obtidas no comércio de plantas medicinais na cidade de Cruz das Almas, Bahia e conduzidas ao laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

### **2.2 Preparo do extrato aquoso**

Os extratos aquosos foram obtidos conforme metodologia descrita por Dahak e Taourirte (2013). O material vegetal, acondicionado em sacos de papel Kraft foi seco em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 40°C, triturado

e submetido à infusão em água destilada. Foi utilizado 80g do material vegetal para 720 mL do solvente à temperatura de 80°C, fechado e sob agitação, durante 24 horas. Em seguida, procedeu-se a filtragem em filtro de papel e posterior liofilização (Terroni™ LS 3000) a temperatura de -20°C. Os extratos foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O rendimento dos extratos aquosos de orégano e tomilho foram calculados por pesagem direta após a remoção do solvente utilizado nas extrações.

### **2.3 Avaliação fitoquímica preliminar**

Os extratos foram submetidos a análise fitoquímica qualitativa para detecção das principais classes de metabólitos secundários seguindo a metodologia de Matos (2009). Para isso, foram realizadas técnicas preliminares simples para detecção de flavonoides (teste Shinoda), taninos (teste de precipitação de ferro), saponinas, alcaloides (Drangendorff), esteroides e triterpenoides (Liebermann-Burchard e Salkowski).

### **2.4 Atividade antioxidante**

Foram utilizadas três metodologias para avaliar o potencial antioxidante dos extratos: os métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilil (DPPH), 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) e poder redutor, em concentrações variando de 0,1 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. O Trolox foi utilizado como referência para os três métodos em concentrações que variaram de 0,015 a 0,09 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **2.4.1 Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

A capacidade em sequestrar o radical livre DPPH foi avaliada conforme metodologia descrita por Hatano et al. (1988), com pequenas modificações. Esta técnica se baseia na capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes. A solução do extrato (0,3 mL) foi posta para reagir com 2,7 mL de solução metanólica de DPPH a uma concentração de  $6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, durante 60 minutos, ao abrigo da luz. A medida da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Global Trend UV-Vis) no comprimento de onda de 517 nm.

O efeito de eliminação do DPPH foi calculado como a porcentagem de descoloração do DPPH, usando a seguinte fórmula:  $[(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$ ,

onde  $A_S$  foi a absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado em um nível particular, e  $A_{DPPH}$  foi a absorvância da solução DPPH. A concentração do extrato aquoso fornecendo 50% de inibição ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico de efeito de captura de porcentagem contra a concentração de extrato na solução.

#### **2.4.2 Método 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS)**

O método ABTS foi realizado conforme descrito por Sánchez et al. (2007), baseado na capacidade da amostra inibir o radical ABTS. O radical ABTS foi gerado mediante reação química do persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), na qual misturou-se 440  $\mu$ L de  $K_2S_2O_8$  a 25 mL de ABTS (7 mmol  $L^{-1}$ ). A solução foi mantida no escuro durante 12-16 horas à temperatura ambiente para formar o radical. Um volume preciso da solução anterior foi diluído em etanol absoluto até uma absorvância de  $0,70 \pm 0,02$  a  $\lambda = 734$  nm (Global Trend UV-Vis). Em seguida, 2 mL da solução do radical ABTS foram misturados com 100  $\mu$ L dos extratos aquosos e a absorvância medida a  $\lambda = 734$  nm. O efeito de eliminação de ABTS e os valores de  $EC_{50}$  foram calculados de acordo com o item 2.4.1.

#### **2.4.3 Poder redutor**

Para o poder redutor foi empregado o procedimento descrito por Berker et al. (2007). 1 mL do extrato foi misturado a 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. A mistura foi incubada a 50°C durante 20 minutos. Após arrefecimento, adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) e os tubos foram agitados vigorosamente em aparelho vortex. Foi retirado 2,5 mL do sobrenadante e acrescentado 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de 0,1% de cloreto férrico e deixado em repouso por 2 minutos para ler as absorvâncias em espectrofotômetro a 700 nm (Global Trend UV-Vis) e posteriormente calculado a  $EC_{50}$ .

#### **2.5 Determinação de fenóis totais**

A determinação de fenóis totais foi realizada conforme metodologia descrita por Slinkard e Singleton (1977), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Aproximadamente 0,120-0,130 g de massa dos extratos foi diluída em metanol,

filtrada e transferida para balão volumétrico de 25 mL, e aferido com metanol. Uma alíquota de 100 µL de cada solução foi transferida para os balões volumétricos de 10 mL e misturado com 500 µL de uma solução de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada. Os balões foram agitados por 1 minuto e adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 20% e água destilada até completar o volume. Após incubação à temperatura ambiente por 2 horas, as mensurações das absorbâncias em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro (Global Trend UV-Vis) no comprimento de onda de 750 nm. Como branco foi usado solução de metanol. Ácido gálico foi usado como solução padrão para se obter a curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato.

## **2.6 Teor total de flavonoide**

O teor total de flavonoides foi determinado usando o Método Dowd adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Para isso, 5 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% ( $\text{AlCl}_3$ ) foi misturado ao mesmo volume dos extratos na concentração  $0.05 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorção a 415 nm (espectrofotômetro Global Trend UV-Vis) usando como amostra branco uma solução de 5 mL de  $\text{AlCl}_3$  (2%) adicionado de 5 mL de metanol. O conteúdo total de flavonoide foi determinado usando uma curva padrão com uma solução de rutina como padrão. A concentração obtida foi expressa como mg de rutina equivalentes QE/100 g de extrato.

## **2.7 Atividade antibacteriana dos extratos de orégano e tomilho**

Para avaliar a atividade antibacteriana foi utilizado uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300) e duas Gram-negativas (*Escherichia coli* (C3OE) e *Salmonella entérica* sorotipo Enteritidis ATCC 13076). A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos de orégano e tomilho foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo conforme as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com adaptações para extratos vegetais. Inicialmente, as cepas foram ativadas em caldo Müller-Hinton por 18-24 horas e a concentração do inóculo ajustada em

espectrofotômetro (SP-22 Biospectro<sup>®</sup>) no comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica de 0,08 a 0,1, correspondendo a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, o inóculo foi ajustado usando diluição 1:100, resultando em uma concentração final de  $1,5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Todos os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água (1:9) e esterilizados por filtração em membrana de celulose (Millipore<sup>™</sup>) 0.22 µm. O teste foi realizado em placa de microtitulação contendo 96 poços e a atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada em concentrações decrescentes a partir de 20 mg.mL<sup>-1</sup> até 0,156 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura, dos extratos e controle de viabilidade dos microrganismos. As placas foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 24 horas.

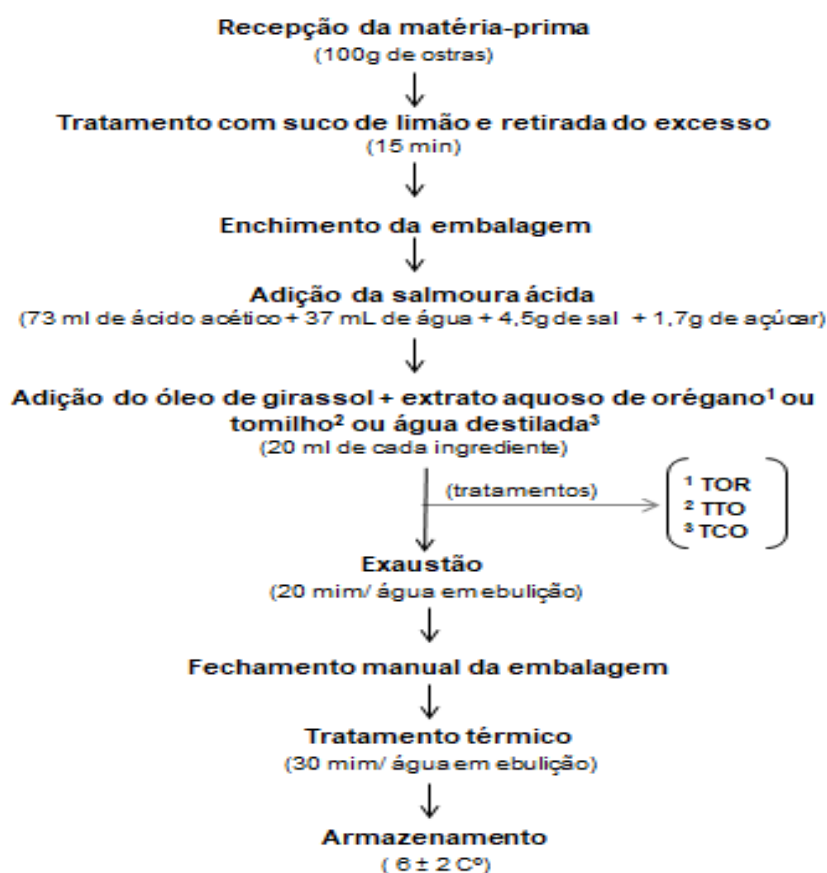
A confirmação de inibição do crescimento bacteriano foi realizada por meio do método colorimétrico que consistiu na adição de 30 µL da solução aquosa de rezasurina sódica (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,01% em todos os poços da placa. A placa foi incubada 37°C e após 2 horas procedeu-se a leitura dos resultados. Os poços que permaneceram de cor azul indicaram que não houve crescimento bacteriano.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), nos poços em que não houve crescimento bacteriano visível, retirou-se uma alíquota de 5 µL, semeando-a em placas Petri contendo Ágar Müeller-Hinton. Após 24 horas de incubação a 36°C foi definido a CBM como a menor concentração dos extratos capaz de causar a morte do inóculo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## **2.8 Elaboração das conservas marinadas de ostras**

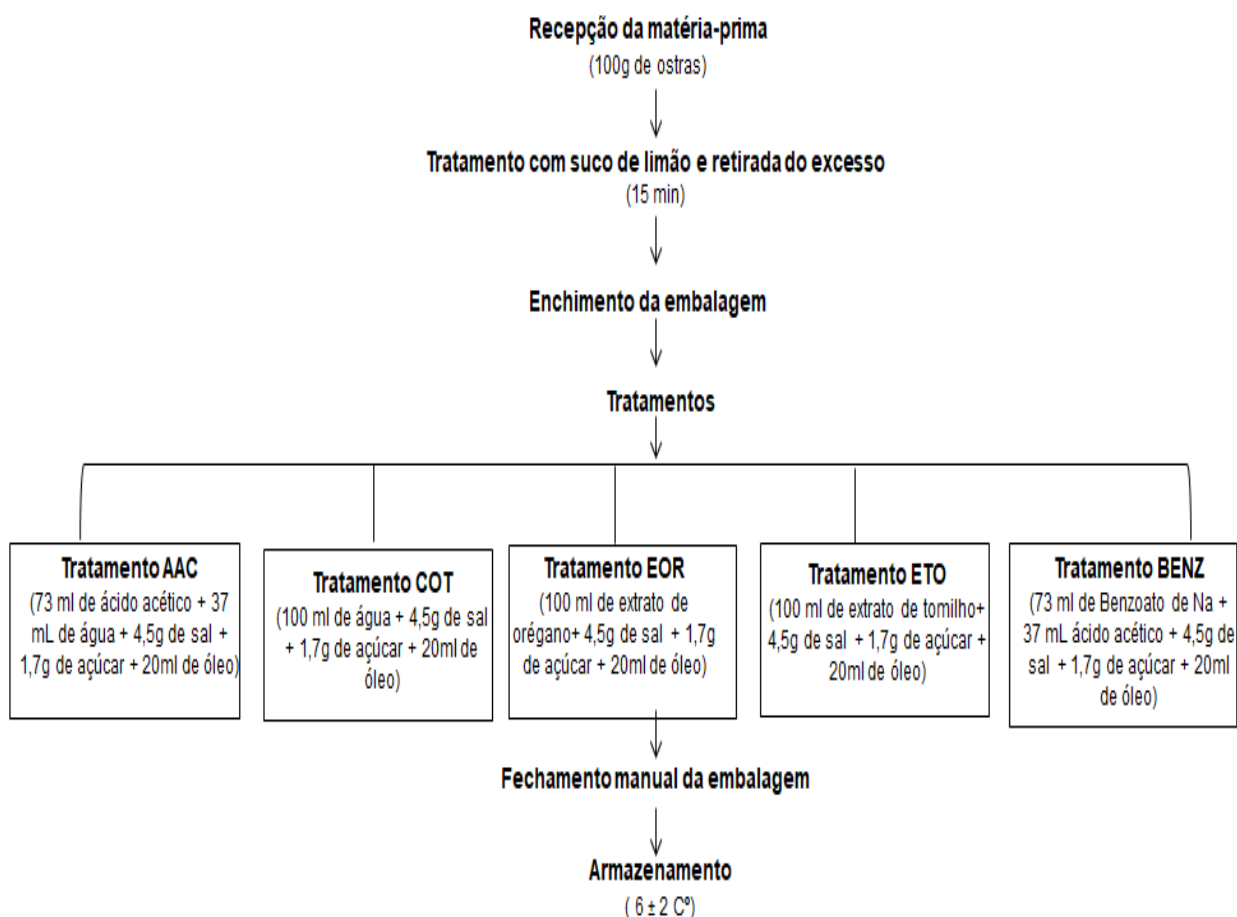
O delineamento experimental para elaboração dos marinados de ostras foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa (Figura 1) foi empregada a tecnologia de obstáculos, em que o controle microbiano foi realizado com adição de salga, acidificação do meio, adição dos extratos de orégano e tomilho como antimicrobiano natural e processo térmico, com os seguintes tratamentos: TCO (salmoura ácida (SA) + 20 mL de água + óleo de girassol (OG)); TOR (AS + 20 mL de extrato de orégano + OG) e TTO (AS + 20 mL de extrato de tomilho + OG).

As ostras foram deixadas de molho por 15 minutos em suco de limão (em uma proporção 1:10) e lavadas em três ciclos de água destilada. Em seguida, 100 g das ostras foram acondicionadas em frasco de vidro (300 mL) previamente esterilizado e adicionado salmoura ácida (SA) (73 mL de ácido acético + 37 mL de água + 4,5 g de sal + 1,7 g de açúcar). Todos os ingredientes foram adicionados após fervura, com final de pH 4,0. Os demais ingredientes: extratos de orégano ou tomilho, óleo de girassol dos tratamentos foram adicionados à temperatura ambiente a uma altura que permitia um espaço livre no interior da embalagem. Para a exaustão, os potes com tampas semi-fechadas foram mergulhados e mantidos em água fervente por 20 minutos, contados a partir do momento em que a salmoura atingiu 90°C. O tratamento térmico foi realizado com os potes fechados e submersos em água fervente por 30 minutos. Decorrido este período, os frascos foram resfriados a 60°C e depois a 38°C. Os frascos foram armazenados sob refrigeração a  $6^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 1.** Fluxograma do processamento do marinado de ostras usando a tecnologia de obstáculos.

Na segunda etapa (Figura 2) foram elaborados marinados de ostras que proporcionassem a observação dos tratamentos aplicados separadamente: tratamento AAC (ostras + SA + 20 mL de OG); tratamento EOR (ostras + 100 mL de extrato de orégano); tratamento ETO (ostras + 100 mL de extrato de tomilho); tratamento BENZ (ostras + 100 mL de benzoato de sódio). O controle foi realizado apenas com água (ostras + 100 mL de água). Em todos os tratamentos foram adicionados ainda 4,5 g de NaCl + 1,7 g de açúcar + 20 ml OG. Tanto o extrato de orégano, de tomilho, como o benzoato de sódio foram adicionados na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Fluxograma elaborado para o processamento dos marinados de ostras na segunda etapa do experimento.

Os frascos foram armazenados sob refrigeração a  $6^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e armazenados durante 120 dias.

A estabilidade das conservas marinadas foi avaliada tendo em vista os aspectos microbiológicos, físico-químicos e sensorial.



## **2.9 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas dos marinados de ostras foram realizadas por meio das técnicas preconizadas pela American Public Health Association (APHA) descritas por Silva et al., (2010). Vinte e cinco gramas da ostra marinada foram homogeneizadas em 225 mL de solução salina a 0,85% estéril com o auxílio de um liquidificador sanitizado, com diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-5}$ . Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo os seguintes ágar seletivos: Ágar Padrão de Contagem (PCA) para contagem de bactérias psicotróficas; Ágar Baird-Parker para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, com posterior confirmação bioquímica com o teste de coagulase. Para a pesquisa de *Escherichia coli*, alíquotas de 1 mL do homogeneizado inicial foram transferidas para 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) em série de cinco tubos com incubação a 35°C por 48 horas. Os tubos positivos (produção de gás e turvação do meio) foram inoculados em caldo *E. coli* (EC) com incubação a 45°C em banho-maria por 24 horas, com posterior isolamentos em Ágar azul de eosina e metileno (EMB), e identificação bioquímica no teste de IMViC.

## **2.10 Análises físico-químicas**

As análises físico e químicas de umidade, cinzas, lipídeos, pH, bases voláteis totais, carboidratos, proteína e nitrogênio e minerais, com exceção do pH, foram realizadas somente nos marinados de ostras (TCO, TOR e TTO). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **2.10.1 Umidade e cinzas**

A umidade (5 g da ostra) foi determinada em estufa a 105°C, até peso constante de acordo com o método descrito no Manual 012 do Instituto Adolph Lutz (IAL, 2008).

A determinação de cinzas foi obtida por incineração da matéria orgânica presente na amostra em forno mufla a 550°C, até peso constante, de acordo com o Manual 018 do IAL (2008).

### **2.10.2 Lipídeos**

A análise de lipídeo foi realizada pelo método de Folch, que consiste em uma extração a frio, usando clorofórmio, metanol e água, mediante o método do Manual 354 do IAL (2008).

### **2.10.3 pH**

Foi determinado em potenciômetro da marca INSTRUTHERM, modelo pH-1800), calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0, em temperatura de 25°C, de acordo com o método do Manual 350 do IAL (2008).

### **2.10.4 Bases voláteis totais (N-BVT)**

Foi transferida 10 g da amostra de ostra moída para um balão de destilação de Kjeldahl, juntando-se a 300 mL de água, 1 a 2 g de óxido de magnésio e umas gotas de silicone antiespumante. Após o balão ligado ao conjunto de destilação, a extremidade afunilada do condensador foi mergulhada em 15 mL de ácido sulfúrico 0,05 M contido no frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, foram adicionadas três gotas do indicador vermelho de metila e postos para aquecimento até ebulição e destilado por 25 minutos. Foi titulado o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com a solução de hidróxido de sódio, até viragem do indicador da cor vermelha para amarela (IAL, 2008).

### **2.10.5 Determinação de carboidratos solúveis**

O extrato bruto para análise de carboidratos solúveis totais foi obtido macerando em almofariz cerca de 200 mg da amostra de ostras liofilizadas com 6 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1mM. O homogeneizado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 10000 x g por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em freezer (-20°C) e utilizado para as determinações de carboidratos solúveis totais. A determinação dos carboidratos solúveis totais foi realizada por espectrofotometria a 490 nm pelo método de fenol-ácido sulfúrico por espectrofotometria (DUBOIS et al., 1956).

### **2.10.6 Teor de proteína bruta e nitrogênio**

O teor de proteína bruta (PB) foi obtido a partir do teor de nitrogênio (N) total nas amostras. O extrato bruto para análise de N total foi preparado por digestão úmida, em uma mistura de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 30%, como descrito por Jones (2001). O material digerido foi ajustado para um volume final de 50 mL com água desmineralizada e utilizado para a análise de N total. A determinação do N total foi realizada por espectrofotometria a 630 nm pelo método fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). Considerando que o teor de N total nas proteínas é de aproximadamente 16%, os teores de PB foram calculados multiplicando-se os resultados de N total por 6,25 (IAL, 2008).

### **2.10.7 Minerais**

Para a determinação de minerais foi preparado o extrato bruto por digestão úmida conforme descrito em Jones (2001). O material digerido foi ajustado para um volume final de 50 mL com água desmineralizada e utilizado para as análises. Um espectrômetro de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas modelo MP-AES 4100/4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado em todas as determinações. A introdução da amostra incluiu um amostrador automático Agilent SPS 3, uma câmara de nebulização ciclônica de dupla passagem e nebulizador OneNeb inerte. Um líquido  $N_2$  Dewar modelo 4107 (Agilent Technologies) foi usado como fonte de gás de plasma. A correção de fundo foi realizada automaticamente usando o software MP Expert. A velocidade da bomba peristáltica foi de 15 rpm. O tempo de estabilização foi de 15 s e o tempo de integração foi de 3 s. Dois parâmetros operacionais críticos (taxa de fluxo do gás nebulizador e posição de visualização). Os comprimentos de onda analíticos (nm) escolhidos foram: Ca II 393.366 e 616.217 (cálcio), P II 213.618 (fósforo), K II 766.491 (potássio), Na II 568.820 e 588.995 (sódio) e Zn II 481.053 (zinco).

### **2.11 Análise sensorial**

A equipe de provadores foi composta por homens e mulheres maiores de idade, em função do hábito de consumo de ostras, interesse e disponibilidade em participar do teste sensorial, totalizando 40 provadores. Antes da análise os

provedores não treinados assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (2.802.351), elaborado conforme resolução CNS/MS N° 196/96. Para a avaliação da aceitação dos marinados foi utilizada uma escala estruturada mista com intensidade (1 a 9) de cada atributo, a saber: sabor, aroma, cor, textura e aspecto (aparência visual). Também foi aplicado teste de preferência com a escala estrutura de nove pontos, indo de 9 “gostei extremamente” até 1 “desgostei extremamente” e os testes de Aceitação e Intenção de compra, ambas com a escala de sete pontos indo de 7 “comeria frequentemente”, “compraria sempre” até 1 “só comeria se não pudesse escolher outro alimento”, “nunca compraria” (ANEXO), respectivamente (MINIM, 2006).

Foram calculados índices de aceitação (IA) e Intenção de compra (IC) dos produtos em tratamentos, segundo a fórmula:  $IA = (Xi \times 100) / N$ , onde  $Xi$  = média da amostra  $i$  e  $N$  = nota máxima da amostra, dada pelos provedores. O IA e IC com boa repercussão foi considerado  $\geq 70\%$  (DUTCOSKY, 2007).

## **2.12 Análises estatísticas**

As contagens de bactérias psicotróficas e *S. aureus* foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnovie e Bartlett, respectivamente. Em seguida, foram submetidas à análise de variância segundo esquema em parcelas subdivididas no tempo do delineamento inteiramente casualizado. As análises univariadas foram realizadas com o programa Sisvar Software, versão 5.6. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a análise conjunta dos dados das características sensoriais e minerais se utilizou análises de componentes principais e discriminantes com objetivo de relacionar e melhor interpretação destas variáveis com os tratamentos, com auxílio do programa SPSS versão 22.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Rendimento dos extratos**

O extrato aquoso de orégano obteve maior rendimento (17,43%) quando comparado ao extrato de tomilho (14,77%). O método extrativo e o solvente são fatores cruciais que influenciam diretamente no rendimento dos extratos vegetais (OLIVEIRA et al., 2016).

Estudo realizado por Pintaro, Fiorani e Jorge (2012), demonstrou que o rendimento obtido em extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum*) 5,71% e orégano (*Origanum vulgare*) 12,75%, ambos da família Lamiaceae, foram melhores quando utilizaram as plantas secas, demonstrando que a utilização do material vegetal previamente desidratado para a obtenção dos extratos pode aumentar a eficiência do processo extrativo, além de estabilizar o produto.

### 3.2. Análise Fitoquímica

Na Tabela 1 estão dispostos os compostos detectados na análise fitoquímica preliminar do extrato aquoso de orégano e tomilho.

**Tabela 1.** Análise fitoquímica preliminar dos extratos aquosos de orégano e tomilho.

Grupos de metabólitos	Extrato de orégano	Extrato de Tomilho
Flavonoides	+++	+++
Taninos	+++	+++
Saponinas	+++	+++
Alcaloides	+++	+++
Esteroides (LB)	-	-
Triterpenoides (LB)	++	-
Esteroides (S)	+++	-
Triterpenoides (S)	-	+++

+ = reação positiva; - = reação negativa; LB = Liebermann-Burchard; S = Salkowski.

Conforme a triagem foi possível identificar variações quanto aos metabólitos secundários nos extratos testados. Não foi constatada a presença de esteroides no extrato de tomilho.

Os metabólitos secundários identificados são substâncias biologicamente ativas geradas pelas plantas e resultantes de um conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em cada célula do vegetal (SIMÕES et al., 2007). Os compostos bioativos resultantes desse metabolismo são os responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos vegetais por atuarem a partir de diversos mecanismos de ação.

### 3.3. Atividade antioxidante dos extratos de orégano e tomilho

Com base nos testes DPPH e ABTS (Tabela 2), o extrato aquoso de tomilho apresentou maior atividade antioxidante, com uma  $EC_{50}$  no valor de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,350 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ou seja, uma menor concentração de extrato foi necessária para neutralizar 50% dos radicais livres, o que demonstra maior potencial antioxidante. No entanto, quando se avaliou a atividade antioxidante dos extratos pelo método do poder redutor verificou-se que este não foi tão eficiente, embora neste caso o extrato aquoso de orégano tenha apresentado menor  $EC_{50}$ .

**Tabela 2.** Atividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) dos extratos aquosos de orégano e tomilho por meio dos métodos DPPH, ABTS e poder redutor.

AMOSTRA	DPPH ( $EC_{50}^a \text{ mg mL}^{-1}$ )	ABTS ( $EC_{50}^a \text{ mg mL}^{-1}$ )	Poder redutor ( $EC_{50}^b \text{ mg mL}^{-1}$ )
EAO <sup>1</sup>	0,400 b	0,410 b	0,620 a
EAT <sup>2</sup>	0,250 a	0,350 a	0,670 b
Trolox	0,024	0,069	0,674

Em cada coluna, e para cada tipo de extrato, letras diferentes significam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

<sup>a</sup> $EC_{50}$  - concentração na qual 50% dos radicais DPPH e ABTS são capturados.

<sup>b</sup> $EC_{50}$  - concentração na qual a absorvância é 0,5.

<sup>1</sup>EAO - extrato aquoso de orégano

<sup>2</sup>EAT- extrato aquoso de tomilho

Os resultados obtidos foram mais satisfatórios que o estudo realizado por Pintaro et al. (2012), ao relatarem valores superiores de  $EC_{50}$  ( $0,623 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) usando o método DPPH em extratos aquosos de orégano de planta seca. Atividade antioxidante menor ( $EC_{50}$  de  $450 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) também foi relatada para o extrato aquoso de tomilho selvagem cultivado na Croácia (KULISIC; DRAGOVIC-UZELAC; MILOS, 2006).

A atividade antioxidante dos extratos vegetais está diretamente ligada à sua composição química, ou seja, a presença de compostos fenólicos (FURLAN et al., 2015). O resultado da melhor atividade antioxidante para o tomilho está diretamente relacionado à maior quantidade de flavonoides que corresponde mais de 50% dentre os compostos fenólicos da composição do extrato (Tabela 3).

**Tabela 3.** Teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos aquosos de orégano e tomilho.

Amostras	Fenóis totais (mg de EAG.g <sup>-1</sup> /amostra)	Flavonoides (mg de EAG.g <sup>-1</sup> /amostra)
Extrato aquoso de orégano	6,35 b ± 0,04	35,82 b ± 2,67
Extrato aquoso de tomilho	6,42 a ± 0,12	55,47 a ± 0,65

Em cada coluna, e para cada tipo de extrato, letras diferentes significam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Devido a sua importância os teores de fenóis em extratos vegetais de orégano e tomilho vêm sendo estudados (LUNA et al., 2010; MARTINS et al., 2014; GONÇALVES, SANTOS; MORAIS, 2015; MARTINS et al., 2015).

Apesar dos extratos pertencerem à família *Lamiacea*, pressupõe que as diferenças encontradas são explicadas mediante as possíveis diferenças genotípicas das espécies estudadas. Além disso, fatores ambientais como a temperatura, características do solo e época de colheita, exercem grande influência no teor desses compostos, o que também torna difícil a comparação entre os diferentes estudos (CHUN et al., 2005; ALEZANDRO et al., 2011; GONÇALVES, SANTOS; MORAIS, 2015).

### 3.4. Atividade antibacteriana dos extratos de tomilho e orégano

A Tabela 4 apresenta a suscetibilidade das bactérias frente aos diferentes extratos. Verifica-se melhor inibição antimicrobiana para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, já que as bactérias Gram negativas, *E. coli* e *S. entérica* Enteretidis se mostraram mais resistentes a ambos os extratos, necessitando de concentrações mais altas (5 a 10 mg mL<sup>-1</sup>) para o extrato de orégano e valores de 10 a 20 mg mL<sup>-1</sup> para o extrato de tomilho.

Estes resultados podem estar relacionados com a composição da parede celular das bactérias. Uma vez que as bactérias Gram-positivas possuem uma estrutura de parede celular mais simples, quimicamente menos complexa e com menor camada lipídica quando comparadas com Gram-negativas, o que as torna menos resistentes aos compostos bioativos presentes nos extratos vegetais (LEMOS et al., 2015; MADIGAN et al., 2016).

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana (CIM e CBM) dos extratos aquosos de orégano e tomilho frente a bactérias Gram positivas e negativas.

Bactérias	Atividade antimicrobiana (mg.mL <sup>-1</sup> )				
	Orégano		Tomilho		Cloranfenicol
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1,25	1,25	1,25	5	0,015
<i>Escherichia coli</i> (C3OE)	10	10	20	20	0,015
<i>Salmonella entérica</i> Enteretidis ATCC 13076	5	5	10	20	0,015

Com base na CIM e CBM dos extratos de orégano e tomilho observou-se variações quanto a faixa de suscetibilidade das cepas testadas de 20 a 1,25 mg mL<sup>-1</sup> para as cepas testadas. De modo geral, o extrato de orégano foi o que melhor apresentou atividade antimicrobiana, inibindo todos os microrganismos testados em concentrações mais baixas, quando comparados com o tomilho.

Essas atividades e variações observadas para os extratos aquosos testados, são decorrentes dos tipos e proporções de metabólitos secundários produzidos por cada uma destas espécies. A composição química de cada espécie vegetal pode ser influenciada por variações climáticas, que podem repercutir diretamente sobre a sua atividade biológica (NASCIMENTO et al., 2008). Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2006) outros aspectos, tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, são exemplos de fatores que influenciam diretamente no conteúdo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Estando todos esses diretamente relacionados como o local de coleta.

A composição química das plantas e a abundância com que os compostos estão disponíveis exerce grande influência na atividade antimicrobiana dos extratos vegetais, os quais pode apresentar diferentes mecanismos de ação em nível celular (BURT, 2004). O potencial antimicrobiano do orégano e do tomilho tem sido amplamente relatado pela literatura, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas (ISMAIL et al., 2012; LICINA et al., 2013; MARTINS et al. 2014; BOSKOVIC et al., 2015; MARTINS et al., 2015; SANGALETI; GEROMEL; FAZIO, 2017).



Os resultados obtidos destacam o uso potencial dos extratos de orégano e tomilho como uma possível alternativa de sua utilização na conservação de alimentos. Isto é de particular importância em relação as bactérias *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* dados os níveis crescentes de seu envolvimento em surtos de doenças veiculadas por alimentos (BRASIL, 2017).

### 3.4. Estabilidade microbiológica dos marinados

Não houve crescimento microbiano nos marinados de ostras submetidos à técnica da tecnologia dos obstáculos, mantendo-se estável durante 120 dias com armazenados à  $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nos tratamentos em que os ingredientes foram avaliados separadamente e sem tratamento térmico verificou-se o crescimento de bactérias psicotróficas (Tabela 5) e *S. aureus* (Tabela 6), com contagens bacterianas iniciais de  $6,11 \log \text{UFC.g}^{-1}$  e  $5,26 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente. A presença de *E. coli* foi observada somente na matéria prima ( $6,11 \log \text{UFC.g}^{-1}$ ).

**Tabela 5.** Contagens média do número de bactérias psicotróficas nos marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

Psicotróficos ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ )					
TRATAMENTOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS	Médias
AAC	0	0	0	0	
COT	5,48 Aa	6,81 b	6,92 b	6,75 b	6,49 B
EOR	5,48 Aa	6,39 Ab	6,11 Ab	6,00 Ab	6,00 A
ETO	5,48 Aa	5,89 Ab	6,11 Ab	5,91 Ab	5,85 A
BENZ	5,48	0	0	0	
<b>Médias</b>	5,48 b	6,36 b	6,38 b	6,22 b	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na vertical não representam diferenças entre os tratamentos enquanto que na horizontal médias pelas mesmas letras minúsculas não representam diferenças entre os dias no período de armazenamento, de acordo com teste de Turkey a 0,5%. AAC - tratamento com ácido acético; COT - tratamento com água (controle); EOR - tratamento com extrato de orégano; ETO - tratamento com extrato de tomilho e BENZ - tratamento com benzoato de sódio.

Verifica-se na Tabela 5 que a partir de 30 dias de armazenamento houve diferença significativa entre os tratamentos, em que as médias do crescimento microbiano no tratamento ETO foram significativamente inferiores que os tratamentos COT e EOR, sem diferença significativa entre si. A mesma tendência foi observada durante todo o período de armazenamento até 120 dias. Ainda na Tabela 5 se verifica que no tempo de 30 dias as médias do número de psicotróficos foi significativamente menor do que nos tempos subsequentes, e estes não apresentaram diferenças significativas entre si, se apresentando estáveis. A acidificação do tratamento AAC favoreceu para a inocuidade do marinado, sendo este o tratamento que obteve maior eficiência entre os demais.

Na Tabela 6, no tratamento COT houve crescimento microbiano, além de diferir significativamente entre si, percebeu-se o aumento no número de colônias bacterianas do período de 30 a 60 dias com diferenças significativas entre as médias. A partir de 90 dias de armazenamento todos os tratamentos apresentaram ausência do microrganismo.

**Tabela 6.** Contagem média de *S. aureus* em marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

<i>Staphylococcus aureus</i> (log UFC.g <sup>-1</sup> )				
TRATAMENTOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS
AAC	0	0	0	0
COT	2,90 Aa	3,20 B	0	0
EOR	0	0	0	0
ETO	0	0	0	0
BENZ	3,20 b			

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula, na vertical não representam diferenças entre os tratamentos enquanto que na horizontal médias pelas mesmas letras minúsculas não representam diferenças entre os dias no período de armazenamento, de acordo com teste de Turkey a 0,5%. AAC - tratamento com ácido acético; COT - tratamento com água (controle); EOR - tratamento com extrato de orégano; ETO - tratamento com extrato de tomilho e BENZ - tratamento com benzoato de sódio.

Os resultados dos tratamentos contendo os extratos de orégano e tomilho para *S. aureus* foram proporcionais aos achados na atividade antimicrobiana in

vitro. Embora os achados para as bactérias psicotróficas não se mostrem tão eficientes, sabe-se que diversos gêneros de bactérias pertencem ao grupo dos psicotróficos, as quais não foram submetidas ao teste in vitro no presente estudo. Portanto, seriam necessários ensaios com concentrações maiores de extrato capaz de apresentar um efeito positivo na eliminação de outros microrganismos.

Outro fator que justifica a baixa eficiência dos extratos para os microrganismos psicotróficos é que a própria matriz alimentar se constitui um meio de cultura completo para o desenvolvimento destes (VELDHUIZEN et al., 2007), e os constituintes da matéria prima podem proteger as bactérias da ação dos extratos vegetais.

Em particular, os experimentos realizados aqui, juntamente com os de Cadun et al. (2008), Rhoades et al. (2013) e Moon et al. (2017) demonstraram a eficácia dos antimicrobianos naturais no controle da deterioração microbiana em marinados de produtos cárneos.

Embora o emprego do ácido acético tenha sido fundamental para manter a inocuidade do marinado, os tratamentos que foram submetidos à tecnologia dos obstáculos tornaram os alimentos mais seguros. Isso indica que a combinação de pH com outros fatores, tais como, os compostos fenólicos presentes nos extratos, além do emprego da temperatura, constituiu um efeito de barreira suficiente para não apenas prevenir o crescimento microbiano, mas para causar uma lenta perda de viabilidade do produto.

Na Tabela 7 consta os valores de pH entre os tratamentos que foram submetidos ao emprego da tecnologia dos obstáculos e os tratamentos que proporcionaram a observação dos ingredientes aplicados separadamente.

De modo geral, o pH dos tratamentos submetidas ao emprego da tecnologia dos obstáculos variaram de 4,1 a 4,6 durante 120 dias. Embora se perceba uma elevação significativa nas médias dos tratamentos a partir de 90 dias de armazenamento, os valores de pH ainda contribuíram para a estabilidade microbiológica dos produtos.

**Tabela 7.** Valores de pH dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

TRATAMENTOS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS
TCO*	4,1 aA	4,2 aA	4,3 aAB	4,5 aB
TOR*	4,1 aA	4,1 aA	4,4 aB	4,6 aB
TTO*	4,1 aA	4,1 aA	4,4 aB	4,6 aB
AAC**	4,8 aA	4,3 aA	4,2 aA	4,4 aA
COT**	6,5 cBC	7,0 cC	5,6 bA	6,0 bBC
EOR**	6,1 bAB	6,6 cB	5,9 bA	7,9 cC
ETO**	6,0 bB	6,1 bB	5,9 bA	6,2 bAB
BENZ**	4,9 aA	4,9 aAB	4,1 aA	4,5 aA

Valores seguidos pela mesma letra, minúscula, na vertical não representam diferenças entre os tratamentos enquanto que na horizontal valores pelas mesmas letras maiúsculas não representam diferenças entre os dias no período de armazenamento, de acordo com teste de Turkey a 0,5%.

\* tratamentos submetidos ao emprego das barreiras. \*\* tratamento com os ingredientes separados. TCO - Tratamentos com água (controle); TOR - tratamento com o extrato de orégano; TTO - tratamentos com o extrato de tomilho. AAC - tratamento com ácido acético; COT - tratamento com água (controle); EOR - tratamento com extrato de orégano; ETO - tratamento com extrato de tomilho e BENZ - tratamento com benzoato de sódio.

Para os tratamentos observados com os ingredientes aplicados separadamente, percebeu-se que no período de 30 a 120 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos AAC e BENZ. Porém, todos os tratamentos permaneceram instáveis, diferindo significativamente entre si durante todo o tempo de armazenamento.

### 3.2 Composição centesimal dos marinados

Mudanças na composição das ostras e dos tratamentos são mostradas na tabela 8. Comparando-se a matéria prima e os tratamentos e com exceção dos teores de lipídeos, sódio e bases voláteis totais (BVT), percebe-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de todos os parâmetros avaliados durante o armazenamento refrigerado ao longo de 120 dias.

**Tabela 8.** Composição centesimal dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

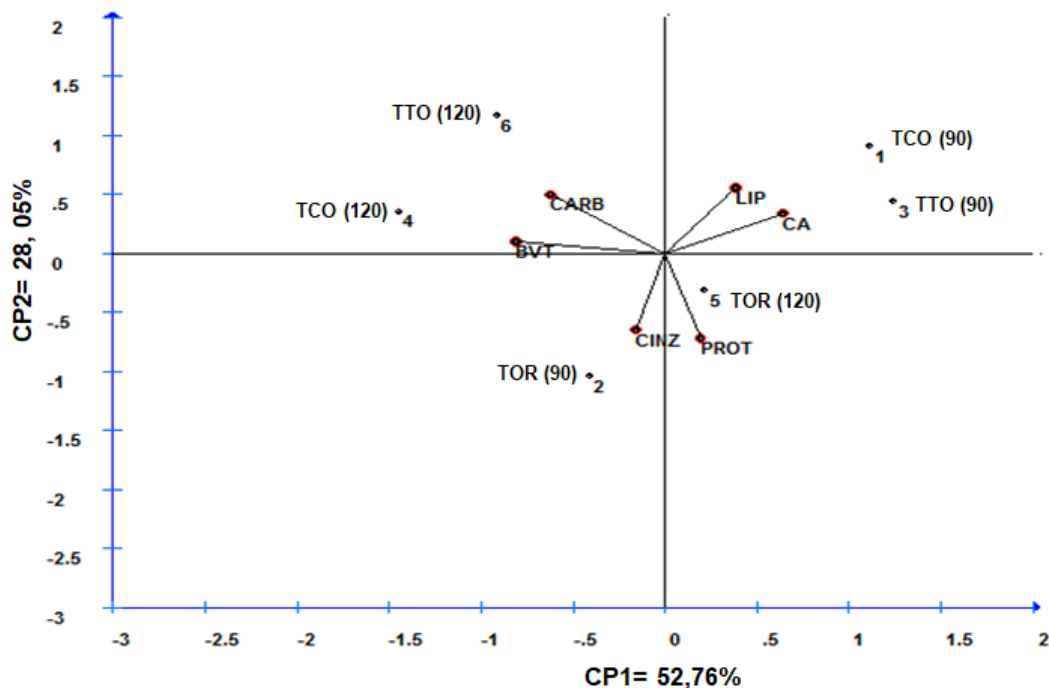
Composição (%)	0 dia	90 dias			120 dias		
	MP	TCO	TOR	TTO	TCO	TOR	TTO
Carboidratos	10,03 a	4,15 b	4,94 b	4,62 b	4,75 b	4,48 b	4,05 b
Proteínas	30,77 a	25,34 b	26,69 b	27,23 b	28,73 ab	26,50 b	28,05 ab
Nitrogênio	4,92 a	4,05 b	4,36 b	4,27 b	4,59 ab	4,24 b	4,49 ab
Lipídios	0,08 a	0,30 b	0,31 b	0,27 ab	0,24 a	0,25 a	0,21 a
Cinzas	4,06 a	8,41 b	9,25 bc	9,71 c	8,72 b	9,63 b	8,49 b
Fósforo	0,112 a	0,027 b	0,028 b	0,030 b	0,032 b	0,028 b	0,026 c
Zinco	0,050 a	0,015 b	0,019 b	0,021 b	0,022 b	0,020 b	0,018 b
Cálcio	0,068 a	0,037 b	0,045 b	0,035 b	0,033 c	0,049 b	0,037 c
Potássio	0,040 a	0,001 c	0,002 b	0,002 b	0,002 b	0,003 b	0,002 b
Sódio	0,033 b	0,490 a	0,516 a	0,521 a	0,521 a	0,482 a	0,525 a
BVT	0,058 a	0,161 b	0,165 b	0,169 b	0,197 b	0,197 b	0,199 b
Umidade	77,9 a	70,51 b	71,3 b	69,6 b	70,6 b	71,8 b	69,6 b

Letras diferentes significam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. BVT- Bases voláteis totais. TCO - Tratamentos com água (controle); TOR - tratamento com o extrato de orégano; TTO - tratamentos com o extrato de tomilho.

No conjunto geral das 12 características avaliadas foram selecionadas seis como de maior importância, considerando-se os critérios abordados para a aplicação da técnica de análise de componentes principais (Figura 3).

Conforme a proximidade dos centroides dos tratamentos em relação às características selecionadas no estudo verificou-se uma redução nos teores de lipídios e cálcio nos tratamentos TCO (1) e TTO (3), enquanto que para os tratamentos TCO (4) e TTO (6) houve elevação nos índices de carboidratos e BVT.

Acréscimos nos teores de cinzas e proteínas também foram registradas sobre o tratamento 2 (FOR) em decorrência ao maior tempo de exposição das ostras à estes produtos de 90 pra 120 dias.



**Figura 3.** Autovalores e autovetores da configuração das características relacionadas ao diagrama de posicionamento dos centróides dos tratamentos de marinados de ostras avaliados aos 90 e 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

TCO - Tratamentos com água (controle); TOR - tratamento com o extrato de orégano; TTO – tratamento com o extrato de tomilho. TCO (1); TOR (2); TTO (3) – 90 dias de armazenamento. TCO (4); TOR (5); TTO (6) – 120 dias de armazenamento. CARB – carboidrato; BVT – bases voláteis totais; CINZ – cinzas; PROT – proteína; CA – cálcio.

Um dos padrões de qualidade do pescado e derivados consiste na análise das BVT, uma medida de compostos nitrogenados protéicos e não protéicos (HUSS, 1995). No presente estudo, apesar desses níveis se elevarem com o tempo de estocagem, supostamente induzidos por ações enzimáticas proteolíticas bacterianas e endógenas (HERNANDEZ-HERRERO et al., 1999), percebe-se que ainda sim as BVT permaneceram dentro dos parâmetros atestados para o frescor do produto (<30,0 mg N-BVT/100g), o que assegurou a sua qualidade (BRASIL, 1997).

Com relação aos aspectos nutricionais, as ostras analisadas pertencem à categoria A da classificação de Stansby e Olcott (1967), por possuírem baixos teores de lipídeos < 5% e alto teores de proteínas 15-20%, o que caracteriza a espécie como sendo de excelente qualidade nutricional. No entanto, estudos vêm

demonstrando que esta composição química pode sofrer variações a depender do período em que são capturadas (PARISENTI et al., 2010; LIRA et al., 2013).

De modo geral, assim como os macronutrientes supracitados, os minerais que foram estudados no presente estudo também podem sofrer variações em suas concentrações. Além disso, devido a seus hábitos alimentares de filtração, estas espécies podem acumular oligoelementos em proporções superiores ao meio aquático em que se encontra inserido (RODNEY et al., 2007).

### 3.2 Teor de flavonoides nos marinados de ostras

A avaliação dos teores de flavonoides nos tratamentos de marinados de ostras, apresentada na tabela 9, foi realizada considerando os teores iniciais encontrados para os extratos. Assim os valores de 55,46 e 35,82 mg de EAG g<sup>-1</sup>/amostra, encontrados para orégano e tomilho respectivamente, foi tomado como 100% de flavonoides disponíveis, diferenças entre tais valores foram registradas, verificando-se também redução significativa ( $p < 0,05$ ) em ambos os tratamentos durante o armazenamento refrigerado ao longo de 120 dias.

**Tabela 9.** Teor de flavonoides dos tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

TEOR DE FLAVONOIDES (mg de EAG g <sup>-1</sup> /amostra) – (%)					
Tratamentos	Extrato Aquoso	30 Dias	60 Dias	90 Dias	120 Dias
TOR	35,82 a (100%)	5,8 b (16,3%)	5,2 b (14,4%)	3,3 b (9,25%)	3,1 b (8,26%)
TTO	55,46 a (100%)	5,9 b (10,56%)	4,8 bc (8,64%)	3,3 bc (5,0%)	2,2 c (5,98%)

Em cada coluna, e para cada tipo de tratamento, letras diferentes significam diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

TOR - tratamento com o extrato de orégano; TTO – tratamento com o extrato de tomilho.

O decaimento do teor de flavonoide inicial de 83,7% a 96,9% para o marinado contendo o extrato de orégano (TOR) e de 89,44% a 94,02% para o marinado contendo o extrato de tomilho (TTO) pode ser atribuída instabilidade da molécula devido a fatores como: temperatura e a luz (SIMÕES et al., 2007).

Dessa forma, supõe que a principal causa na redução foi decorrente da embalagem empregada (frasco de vidro transparente) para o acondicionamento dos marinados e a temperatura (90°C) empregada para o processo de pasteurização

A utilização de extratos vegetais em alimentos se apresenta como uma das propostas benéficas para a saúde humana. No tocante aos flavonoides muito se tem discutido seus efeitos protetores contra doenças neurodegenerativa e câncer, além de auxiliar na diminuição de radicais livres em virtude de sua capacidade antioxidante (ANGELIS, 2006).

### **3.3 Análise sensorial**

Traçando-se o perfil dos 40 provadores da análise sensorial, 20 eram homens e 20 eram mulheres, com faixa etária entre 21 a 52 anos. Para os tratamentos TCO, TOR e TOT o Índice de Aceitabilidade % (IA) foi de:  $77,50 \pm 4,11$ ;  $83,21 \pm 3,06$  e  $80,36 \pm 4,2$ , respectivamente. Seguindo a mesma ordem para a intenção de comprar % (IC) os valores obtidos foram  $76,00 \pm 4,19$ ;  $76,78 \pm$  e  $73,57 \pm 5,49$ , respectivamente.

Na aplicação da análise multivariada através da técnica de análise de componentes principais (ACP) (Tabela 10) as variâncias explicadas pelos valores próprio iniciais em que as três primeiras componentes possuíam alto valores superiores a 1, determinaram 78,60% da variabilidade total. Sendo que a CP1 com 48,83% identificou que os atributos de maior importância com intercorrelações positivas foram para taxa de aceitação (0,901), taxa de intenção de compra (0,876) e taxa de preferência (0,828).

O segundo componente definido por CP2 com 17,21% da variação total, representada por aspecto (0,867), textura (0,852) e cor (0,763) de importância intermediária e a terceira componente CP3 obteve (12,56%) da variância total explicada, identificada pelo aroma (0,866) e sabor (0,781), com magnitude as características de menor importância. Verifica-se ainda que na Tabela 9 o valor de  $KMO = 0,725$ , mostra que o índice que torna a técnica aceitável e o valor de  $\chi^2 = 225,62^{**}$  tem significância ( $p < 0,01$ ).



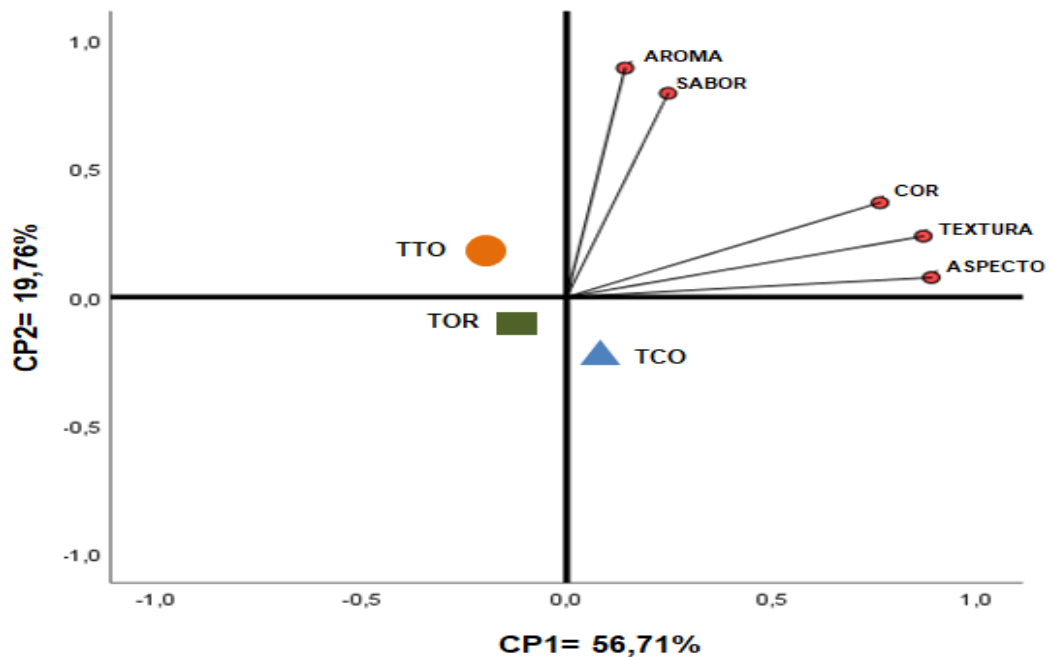
**Tabela 10.** Matriz de correlação dos componentes principais rotacionados das características e atributos, autovalor e percentagem de variação nas CPs para os tratamentos de marinados de ostras durante 120 dias de armazenamento sob refrigeração.

ATRIBUTOS	CP1	CP2	CP3
TESTE DE PREFERÊNCIA	<b>0,828</b>	0,143	0,272
TESTE DE ACEITAÇÃO	<b>0,901</b>	0,134	0,131
TESTE DE INT. COMPRA	<b>0,876</b>	0,274	0,063
COR	0,153	<b>0,763</b>	0,346
TEXTURA	0,190	<b>0,852</b>	0,215
ASPECTO	0,194	<b>0,867</b>	0,043
SABOR	0,145	0,244	<b>0,781</b>
AROMA	0,176	0,142	<b>0,866</b>
Autovalores	3,906	1,377	1,005
Variância explicada (%)	48,825	17,213	12,557
Variância explicada acumulada (%)	48,825	66,038	78,595

CP – componentes principais.

O posicionamento de centroides que identifica os tratamentos TCO, TOR e TTO em relação ao alto vetor das características sensoriais Figura 4, revela que no compito geral, face a essas características tem-se que os 3 tratamentos se encontram muito próximos entre si e da origem, apesar em setores distintos.

Esses resultados indicam por que o teste de Rottele não determina diferenças estatísticas entre os tratamentos. Admitindo-se, portanto que as maiores variações das notas foram registradas entre as características e pouca variação que discriminasse os tratamentos. Esses resultados explicam a grande aceitação, acima de 70%, dos provadores para todos os produtos testados.



**Figura 4.** Autovalores e autovetores da configuração e diagrama de ordenação das características e atributos para os tratamentos de marinados de ostras.

TCO - Tratamentos com água (controle); TOR - tratamento com o extrato de orégano; TTO – tratamento com o extrato de tomilho.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições estudadas, verificou-se que além dos extratos aquosos de orégano e tomilho apresentarem atividade antimicrobiana e antioxidante satisfatórias, estes se mostraram possíveis ingredientes no desenvolvimento de alimentos funcionais por representarem uma importante alternativa para melhoria da ingestão de flavonoides nos alimentos. Os dados do estudo são de extrema importância, ao passo que perspectivas futuras visam à utilização de extratos vegetais tanto no controle e conservação de alimentos, quanto nas indústrias químicas e farmacêuticas, sem que haja prejuízos ao ambiente e a saúde humana.

## 5. REFERÊNCIAS

ALEZANDRO, M. R. et al. Commercial spices and industrial ingredients: evaluation of antioxidant capacity and flavonoids content for functional foods development. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 527-533, 2011.

ALMEIDA FILHO, E.S.; SIGARINI, C. O.; DELMONDES, E. C.; STELATTO, E.; ARAUJO Jr, A. Características microbiológicas do pinato comercializados em supermercados e feiras-livres no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**, v 16, número 99, 2002.

ANGELIS, R. C. **A Importância dos Alimentos Vegetais na Proteção da Saúde**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 317 p.

ANTUNES, R M P et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p.517-524. 2006.

ARVOUET-GRAND, A et al. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **Journal de Pharmacie de Belgique**. France, p. 462-468. dez. 1994.

BERKER, K. I. et al. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, Istanbul, v. 72, n. 3, p.1157-1165, maio 2007.

BOSKOVIC, M. et al. Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. **Procedia Food Science**, v. 5, n. 1, p. 18-21, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria 185, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2017. 17 slides, color. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em 29 de nov. 2017.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, 223-253, 2004.

CADUN, A.; KdşLA, D.; ÇAKLđ, Ş. Marination of deep-water pink shrimp with rosemary extract and the determination of its shelf-life. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.81-87, jul. 2008.

CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 42, n. 1, p.9-14. 2010.

CHO, T.J et al. Survival of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*) in raw ready-to-eat crab marinated in soy sauce. **International Journal of Food Microbiology**. South Korea, p. 50-55. dez. 2016.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

DAHAK, K.; TAOURIRTE, M. Comparative study of in vitro antimicrobial activities of *Foeniculum vulgare* Mill. (Umbelliferae) extract. **Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 115-120, 2013.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p.350-356,1956.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2007.

FURLAN, C. M. et al. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal Of Botany**. São Paulo, p. 693-702. dez. 2015.

GIACOMETTI, J. et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food Research International**, [s.l.], v. 113, p.245-262, nov. 2018.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-81, 2007.

GONÇALVES, J. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade Antioxidante, Compostos Fenólicos Totais E Triagem Fitoquímica De Ervas Condimentares Desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p.486-497, jul. 2015.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F.J.. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends In Food Science & Technology**, Ponta Grossa, v. 62, p.13-22, fev. 2017.

HATANO, T. et al. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Okayama, v. 36, n. 6, p.2090-2097, 1988.

HERNANDEZ-HERRERO, M. M. et al. Total Volatile Basic Nitrogen and other Physico-chemical and Microbiological Characteristics as Related to Ripening of Salted Anchovies. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.344-347, mar. 1999.

HUSS, H. H. **Quality and quality changes in fresh fish**. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, 1995.

Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Zenebon, O.; Pascuet, N.S.; Tiglea, P. (Coord.). São Paulo; Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. 2008. 1020p.

ISMAIL, M. M. et al. Screening for the Antimicrobial Activities of Alcoholic and Aqueous Extracts of Some Common Spices in Egypt. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 3, p. 200-207, 2012.

JONES, J. B. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. Printed in the United States of America. Chemical Rubber Company. Press, p. 205-206, 2001.

KARGIOTOU, C. et al. Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.158-163, fev. 2011.

KULISIC, T.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; MILOS, M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. **Food Technology And Biotechnology**, Croatia, v. 444, p.485-492, out. 2006.

LEMOS, M. F. et al. Seasonality modifies Rosemary's composition and biological activity. **Industrial Crops and Products**, v. 70, n. 1, p. 41-47, 2015.

LICINA, B. Z. et al. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. **Food Control**. Usa, p. 498-504. mar. 2013.

LIRA, G. M. et al. Influence of seasonality on the chemical composition of oysters (*Crassostrea rhizophorae*). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 138, n. 2-3, p.786-790, jun. 2013.

LUNA, A.; LÁBAQUE, M.C.; ZYGADLO, J.A.; MARIN, R.H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370, 2010. DOI: 10.3382/ps.2009-00130.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos**. 2011. Embrapa Agroindústria Tropical.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae: Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of food Technology**, v.10, p.96-103, 2007.

MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. **Food Chemistry**. Salamanca, p. 131-137. 2015.

MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **Food Chemistry**, Salamanca, p. 73-80. 2014.

MATOS, J. F. de A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza, CE: UFC, 2009.

MINIM, V. P.R. **Análise Sensorial: estudo com consumidores**. Viçosa: Editora Ufv, 2006.

MOON, H. et al. Teriyaki sauce with carvacrol or thymol effectively controls Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and indigenous flora in marinated beef and marinade. **Meat Science**, [s.l.], v. 129, p.147-152, jul. 2017.

OLIVEIRA, V. B et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausura de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p.230-239, 2016.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V.L.C.G.; DANIEL BARRERA ARELLANO, D.B. composição de esteróis e ácidos graxos de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis – SC, em duas estações do ano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. P 73-76, 2010.

PINTARO, S. P.; FIORANI, L.V.; JORGE, N. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 686-691, 2012.

RHOADES, J. et al. Use of marination for controlling *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in raw beef. **Food Microbiology**, Greece, v. 32, n. 2, p.248-253, dez. 2013.

RODNEY, E. et al. Bioaccumulation and Tissue Distribution of Arsenic, Cadmium, Copper and Zinc in *Crassostrea virginica* Grown at Two Different Depths in Jamaica Bay, New York. **In Vivo**, Brooklyn, v. 29, n. 1, p.16-27, 2007.

SÁNCHEZ, C.S. et al. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Analytica Chimica Acta**, Granada, v. 593, n. 1, p.103-107, jun. 2007.

SANGALETI, T. P.; GEROMEL, M. R.; FAZIO, M. L. S. Atividade antibacteriana de extratos aquosos de açafrão, cominho, estragão, endro e tomilho. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 1, p. 113-117, 2017.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de análise microbiológica**. Ed. Varela. 4 ed. São Paulo. 552p. 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2007. 1104 p.

SLINKARD K.; SINGLETON VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**. 1977;28:49-55.

STANSBY, M. E.; OLCOTT, H. S. 1967. Composición del pescado. In: STANSBY, M. E.; DASSOW, J. A. **Tecnología de la Industria Pesquera**. Zaragoza: Acribia, p. 391 - 402.

VELDHUIZEN, E. J. et al. Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. **Journal Of Food Protection**, v. 70, n. 9, p.2127-2132, set. 2007.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, p.971-974, jul. 1967.

YANG, J. et al. Inactivation by lemon juice of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* in beef marinating for the ethnic food kelaguen. **International Journal Of Food Microbiology**, Mangilao, v. 160, n. 3, p.353-359, jan. 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Por se tratar de animais considerados bioacumuladores o consumo de ostras sem nenhum tratamento prévio pode oferecer sérios riscos de intoxicação e/ou infecções alimentares em virtude da presença de microrganismos patogênicos.
- O tratamento e/ou processamento desses animais a partir da técnica de marinação contribui para que os níveis de determinados microrganismos presentes em sua carne sejam reduzidos.
- Produtos marinados são uma excelente alternativa de produtos semiconservados que garantem segurança necessária ao consumidor, vida útil adequada, além de possibilitarem alimentos aceitáveis sob o ponto de vista organoléptico.
- Extratos vegetais com elevada atividade microbiana e antioxidante visam aumentar a eficiência de produtos marinados a fim de se obter um melhor controle microbiológico desses alimentos, além de contribuírem agregando valor econômico ao produto desenvolvido.
- Em virtude do crescimento do consumo de pescado há uma necessidade de mudanças no cenário de comercialização no tocante à segurança alimentar, além do desenvolvimento de novas técnicas que garantam a conservação destes alimentos.



## ANEXOS

### ANÁLISE SENSORIAL DE OSTRAS MARINADAS TESTE DE PERFIL DE CARACTERÍSTICAS

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

Data: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( ) Idade: \_\_\_\_\_ anos

Você é um consumidor habitual deste tipo de produto? ( ) SIM ( ) NAO

**Instruções:** Você está recebendo TRES amostras de ostras marinadas que devem ser degustadas cuidadosamente. Utilize a escala abaixo para avaliar os atributos sensoriais das amostras e anote o valor de sua avaliação para cada amostra na tabela a seguir. Enxágue a boca com água após a degustação de cada amostra e coma uma porção de biscoito água e sal para a limpeza da cavidade bucal, e espere trinta segundos.

#### Atributos de qualidade:

##### SABOR

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ 7 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 9 \_\_\_\_\_  
Fraco moderado forte

##### AROMA

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ 7 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 9 \_\_\_\_\_  
Fraco moderado forte

##### COR

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ 7 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 9 \_\_\_\_\_  
Fraco moderado forte

##### TEXTURA

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ 7 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 9 \_\_\_\_\_  
Fraco moderado forte

##### ASPECTO (APARÊNCIA VISUAL)

1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 6 \_\_\_\_\_ 7 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 9 \_\_\_\_\_  
Fraco moderado forte

Atributos	Amostra 407	Amostra 805	Amostra 109
Sabor			
Aroma			
Cor			
Textura			
Aspecto			

Ordem das amostras por preferência:

1º \_\_\_\_\_ 2º \_\_\_\_\_ 3º \_\_\_\_\_

### TESTE DE PREFERENCIA

- (1) Desgostei extremamente
- (2) Desgostei muito
- (3) Desgostei moderadamente
- (4) Desgostei ligeiramente
- (5) Indiferente

- (6) Gostei ligeiramente
- (7) Gostei moderadamente
- (8) Gostei muito
- (9) Gostei extremamente

Código	Nota
407	
805	
109	

### COMENTARIOS

---

---

### TESTE DE ACEITAÇÃO – Atitude

- (7) Comeria frequentemente
- (6) Comeria sempre que tivesse a oportunidade
- (5) Comeria de vez em quando
- (4) Comeria se estivesse acessível, mas não me esforçaria para isso

- (3) Comeria ocasionalmente
- (2) Raramente comeria
- (1) Só comeria se não pudesse escolher outro alimento

Nota (amostra 407): \_\_\_\_\_

Nota (amostra 805): \_\_\_\_\_

Nota (amostra 109): \_\_\_\_\_

### COMENTARIOS

---

---

### TESTE DE INTENCAO DE COMPRA

- 7= compraria sempre
- 6= compraria muito frequentemente
- 5= compraria frequentemente
- 4= compraria ocasionalmente
- 3 =compraria raramente
- 2= compraria muito raramente
- 1= nunca compraria

Nota (amostra 407): \_\_\_\_\_

Nota (amostra 805): \_\_\_\_\_

Nota (amostra 109): \_\_\_\_\_

# INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## NORMAS PARA SUBMISSÃO

### 1. CONTEÚDO E CLASSIFICAÇÃO DOS DOCUMENTOS PARA PUBLICAÇÃO

Serão aceitos manuscritos de abrangência nacional e/ou internacional que apresentem novos conceitos ou abordagens experimentais e que não sejam apenas repositórios de dados científicos. Trabalhos que contemplam especificamente metodologias analíticas serão aceitos para publicação desde que elas sejam inovadoras ou proporcionem aperfeiçoamentos significativos de métodos já existentes. Ficará a critério dos editores, a depender da relevância do tema, a aceitação de trabalhos que tenham resultados da análise de produtos industrializados sem informações que permitam reproduzir a sua obtenção. Não serão aceitos para publicação trabalhos que visam essencialmente à propaganda comercial.

Os documentos publicados no BJFT classificam-se nas seguintes categorias:

**1.1. ARTIGOS CIENTÍFICOS ORIGINAIS:** São trabalhos que relatam a metodologia, os resultados finais e as conclusões de pesquisas originais, estruturados e documentados de modo que possam ser reproduzidos com margens de erro iguais ou inferiores aos limites indicados pelo autor. O trabalho não pode ter sido previamente publicado, exceto de forma preliminar como nota científica ou resumo de congresso.

**1.2. ARTIGOS DE REVISÃO:** São extratos inter-relacionados da literatura disponível sobre um tema que se enquadre no escopo da revista e que contenham conclusões sobre o conhecimento disponível. Preferencialmente devem ser baseados em literatura publicada nos últimos cinco anos.

**1.3 NOTAS CIENTÍFICAS:** São relatos parciais de pesquisas originais que, devido à sua relevância, justificam uma publicação antecipada. Devem seguir o mesmo padrão do Artigo Científico, podendo ser, posteriormente, publicadas de forma completa como Artigo Científico.

**1.4. RELATOS DE CASO:** São descrições de casos, cujos resultados são tecnicamente relevantes.

**1.5. RESENHAS CRÍTICA DE LIVRO:** Trata-se de uma análise de um ou mais livros impressos ou online, que apresenta resumo e análise crítica do conteúdo.

**1.6. COMENTÁRIOS DE ARTIGOS:** Um documento cujo objeto ou foco é outro artigo ou outros artigos.

**1.7. COMUNICAÇÕES RÁPIDAS:** Atualização de uma pesquisa ou outros itens noticiosos.

Os manuscritos podem ser apresentados em português, inglês ou espanhol.

## **2. ESTILO E FORMATAÇÃO**

### **2.1. FORMATAÇÃO**

- Editor de Textos Microsoft WORD 2010 ou superior, não protegido.
- Fonte Arial 12, espaçamento duplo entre linhas. Não formate o texto em múltiplas colunas.
- Página formato A4 (210 x 297 mm), margens de 2 cm.
- Todas as linhas e páginas do manuscrito deverão ser numeradas sequencialmente.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

- A itemização de seções e subseções não deve exceder 3 níveis.
- O número de páginas, incluindo Figuras e Tabelas no texto, não deverá ser superior a 20 para Artigos Científicos Originais e de Revisão e a 9 para os demais tipos de documento. Sugerimos que a apresentação e discussão dos resultados seja a mais concisa possível.
- Use frases curtas.

**2.2. UNIDADES DE MEDIDAS:** Deve ser utilizado o Sistema Internacional de Unidades (SI) e a temperatura deve ser expressa em graus Celsius.

**2.3. TABELAS E FIGURAS:** Devem ser numeradas em algarismos arábicos na ordem em que são mencionadas no texto. Seus títulos devem estar imediatamente acima das Tabelas e imediatamente abaixo das Figuras e não devem conter unidades. As unidades devem estar, entre parênteses, dentro das Tabelas e nas Figuras. Fotografias devem ser designadas como Figuras. A localização das Tabelas e Figuras no texto deve estar identificada.

As TABELAS devem ser editadas utilizando os recursos próprios do editor de textos WORD para este fim, usando apenas linhas horizontais. Devem ser autoexplicativas e de fácil leitura e compreensão. Notas de rodapé devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas. Demarcar primeiramente as colunas e depois as linhas e seguir esta mesma sequência para as notas de rodapé.

As FIGURAS devem ser utilizadas, de preferência, para destacar os resultados mais expressivos. Não devem repetir informações contidas em Tabelas. Devem ser apresentadas de forma a permitir uma clara visualização e interpretação do seu conteúdo. As legendas devem ser curtas, autoexplicativas e sem bordas. As Figuras (gráficos e fotos) devem ser coloridas e em alta definição (300 dpi), para que sejam facilmente interpretadas. As fotos devem estar na forma de arquivo JPG ou TIF. As Figuras devem ser enviadas (File upload) em arquivos individuais, separadas do texto principal, na submissão do manuscrito. Estes arquivos individuais devem ser nomeados de acordo com o número da figura. Ex.: Fig1.jpg, Fig2.tif etc.

**2.4. EQUAÇÕES:** As equações devem aparecer em formato editável e apenas no texto, ou seja, não devem ser apresentadas como figura nem devem ser enviadas em arquivo separado.

Recomendamos o uso do MathType ou Editor de Equações, tipo MS Word, para apresentação de equações no texto. Não misture as ferramentas MathType e Editor de Equações na mesma equação, nem tampouco misture estes recursos com inserir símbolos. Também não use MathType ou Editor de Equações para apresentar no texto do manuscrito variáveis simples (ex.,  $a=b^2+c^2$ ), letras gregas e símbolos (ex.,  $\alpha$ ,  $\infty$ ,  $\Delta$ ) ou operações matemáticas (ex.,  $x$ ,  $\pm$ ,  $\geq$ ). Na edição do texto do manuscrito, sempre que possível, use a ferramenta “inserir símbolos”.

Devem ser citadas no texto e numeradas em ordem sequencial e crescente, em algarismos arábicos entre parênteses, próximo à margem direita.

**2.5. ABREVIATURAS e SIGLAS:** As abreviaturas e siglas, quando estritamente necessárias, devem ser definidas na primeira vez em que forem mencionadas. Não use abreviaturas e siglas não padronizadas, a menos que apareçam mais de 3 vezes no texto. As abreviaturas e siglas não devem aparecer no Título, nem, se possível, no Resumo e Palavras-chave.

#### **2.6 NOMENCALTURA:**

Reagentes e ingredientes: preferencialmente use o nome internacional não-proprietário (INN), ou seja, o nome genérico oficial.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

Nomes de espécies: utilize o nome completo do gênero e espécie, em itálico, no título (se for o caso) e no manuscrito, na primeira menção. Posteriormente, a primeira letra do gênero seguida do nome completo da espécie pode ser usado.

### **3. ESTRUTURA DO ARTIGO**

**PÁGINA DE ROSTO:** título, título abreviado, autores/filiação (deverá ser submetido como Title Page)

**3.1. TÍTULO:** Deve ser claro, conciso e representativo do assunto tratado. Deve ser escrito em caixa alta e não exceder 150 caracteres, incluindo espaços. O manuscrito em português ou espanhol deve também apresentar o Título em inglês e o manuscrito em inglês deve incluir também o Título em português.

**3.2. TÍTULO ABREVIADO (RUNNING HEAD):** Deve ser escrito em caixa alta e não exceder 50 caracteres, incluindo espaços.

**3.3. AUTORES/FILIAÇÃO:** São considerados autores aqueles com efetiva contribuição intelectual e científica para a realização do trabalho, participando de sua concepção, execução, análise, interpretação ou redação dos resultados, aprovando seu conteúdo final. Havendo interesse dos autores, os demais colaboradores, como, por exemplo, fornecedores de insumos e amostras, aqueles que ajudaram a obter recursos e infraestrutura e patrocinadores, devem ser citados na seção de agradecimentos. O autor de correspondência é responsável pelo trabalho perante a Revista e, deve informar a contribuição de cada coautor para o desenvolvimento do estudo apresentado.

Devem ser fornecidos os nomes completos e por extenso dos autores, seguidos de sua filiação completa (Instituição/Departamento, cidade, estado, país) e endereço eletrônico (e-mail). O autor para correspondência deverá ter seu nome indicado e apresentar endereço completo para postagem.

Para o autor de correspondência:

Nome completo (\*autor correspondência)

Instituição/Departamento (Nome completo da Instituição de filiação quando foi realizada a pesquisa)

Endereço postal completo (Logradouro/ CEP / Cidade / Estado / País)

Telefone

e-mail (não utilizar os provedores hotmail e uol no cadastro do autor de correspondência, pois o sistema de submissão online ScholarOne, utilizado **pela** revista, não confirma a solicitação de envio de e-mail feita por estes provedores)

Para co-autores:

Nome completo

Instituição/Departamento (Filiação quando realizada a pesquisa)

Endereço (Cidade / Estado / País)

e-mail

**DOCUMENTO PRINCIPAL:** título, resumo, palavras-chave, texto do artigo com a identificação de figuras e tabelas

**3.4. RESUMO:** Deve incluir objetivo(s) ou hipótese da pesquisa, material e métodos (somente informação essencial para a compreensão de como os resultados foram obtidos), resultados mais significativos e conclusões do trabalho, contendo no máximo 2.000 caracteres (incluindo espaços). Não usar abreviaturas e siglas. Os artigos em português ou espanhol devem também apresentar Resumo em inglês e os artigos em inglês devem incluir também o Resumo em português.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

**3.5. PALAVRAS-CHAVE:** Devem ser incluídas no mínimo 2, logo após o Resumo e Summary, até no máximo 6 palavras indicativas do conteúdo do trabalho, que possibilitem a sua recuperação em buscas bibliográficas. Evitar termos que apareçam no título. Os artigos em português ou espanhol devem também apresentar as Palavras-chave em inglês e os artigos em inglês devem incluir também as Palavras-chave em português.

**3.6. INTRODUÇÃO:** Deve reunir informações para uma definição clara da problemática estudada, fazendo referências à bibliografia atual, preferencialmente de periódicos indexados, e da hipótese/objetivo do trabalho, de maneira que permita situar o leitor e justificar a publicação do trabalho. Visando à valorização da Revista, sugere-se, sempre que pertinente, a citação de artigos publicados no BJFT.

**3.7. MATERIAL E MÉTODOS:** Deve possibilitar a reprodução do trabalho realizado. A metodologia empregada deve ser descrita em detalhes apenas quando se tratar de desenvolvimento ou modificação de método. Neste último caso, deve destacar a modificação efetuada. Todos os métodos devem ser bibliograficamente referenciados ou descritos.

**3.8. RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados devem ser apresentados e interpretados dando ênfase aos pontos importantes que deverão ser discutidos com base nos conhecimentos atuais. Deve-se evitar a duplicidade de apresentação de resultados em Tabelas e Figuras. Sempre que possível, os resultados devem ser analisados estatisticamente.

**3.9. CONCLUSÕES:** Neste item deve ser apresentada a essência da discussão dos resultados, com a qual se comprova, ou não, a hipótese do trabalho ou se ressalta a importância ou contribuição dos resultados para o avanço do conhecimento. Este item não deve ser confundido com o Resumo, nem ser um resumo da Discussão.

**3.10. AGRADECIMENTOS:** Deve ser feita a identificação completa da agência de fomento, constando seu nome, país e nº do projeto. Outros agradecimentos a pessoas ou instituições são opcionais.

### **3.11. REFERÊNCIAS:**

#### 3.11.1 Citações no Texto

Citação direta: Transcrição textual de parte da obra do autor consultado (Especificar no texto a(s) página(s), volume(s), tomo(s) ou seção(ões) da fonte consultada).

Citação indireta: Texto baseado na obra do autor consultado (Indicar apenas a data).

Nas citações bibliográficas no texto (baseadas na norma ABNT NBR 10520: 2002), as chamadas pelo sobrenome do autor, pela instituição responsável ou título incluído na sentença devem ser em letras maiúsculas e minúsculas e, quando estiverem entre parênteses, devem ser em letras maiúsculas (caixa alta).

#### **Exemplos:**

Guerrero e Alzamorra (1998) obtiveram bom ajuste do modelo.

Esses resultados estão de acordo com os verificados para outros produtos (CAMARGO; RASERAS, 2006; LEE; STORN, 2001).

(COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 1992, p. 34)

(ANTEPROJETO..., 1987, p. 55).

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

As citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados num mesmo ano, são distinguidas pelo acréscimo de letras minúsculas, em ordem alfabética, após a data e sem espaçamento, conforme a lista de referências.

#### **Exemplos:**

De acordo com Reeside (1927a)

(REESIDE, 1927b)



Para citação de citação deve-se utilizar a expressão “apud” (citado por, conforme, segundo) após o ano de publicação da referência, seguida da indicação da fonte secundária efetivamente consultada.

Exemplos:

No texto:

“[...] o viés organicista da burocracia estatal e o antiliberalismo da cultura política de 1937, preservado de modo encapuçado na Carta de 1946.” (VIANNA, 1986, p. 172 apud SEGATTO, 1995).

Sobre esse assunto, são esclarecedoras as palavras de Silva (1986 apud CARNEIRO, 1981).

### 3.11.2 Referências

A lista de referências deve seguir o estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Norma: NBR 6023, de agosto de 2002, na seguinte forma:

- As referências são alinhadas somente à margem esquerda do texto e de forma a se identificar individualmente cada documento, em espaço simples e separadas entre si por espaço duplo.
- O recurso tipográfico (negrito, grifo ou itálico) utilizado para destacar o elemento título deve ser uniforme em todas as referências de um mesmo documento.
- Citar o nome de todos os autores nas Referências, ou seja, não deve ser usada a expressão “et al.”
- Monografias (Livros, manuais e folhetos como um todo)

Sobrenome e iniciais dos prenomes do autor (nomes de mais de 1 autor devem ser separados por ponto e vírgula). Título (em negrito): subtítulo. Edição (n. ed.), Local de Publicação: Editora, data de publicação. Número de páginas.

Exemplos:

Impressos:

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 680 p.

HOROWITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed., 3rd rev. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. 1 v.

PERFIL da administração pública paulista. 6. ed. São Paulo: FUNDAP, 1994. 317 p.

Eletrônicos:

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

SZEMPLENSKI, T. Aseptic packaging in the United State. 2008. Disponível em: <<http://www.packstrat.com>>. Acesso em: 19 maio 2008.

- Parte de monografias (Capítulos de livros, volume, fragmento, parte)

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. Título do livro (em negrito). Edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. capítulo, página inicial-final da parte.

Exemplo:

Impressos:

ZIEGLER, G. Product design and shelf-life issues: oil migration and fat bloom. In: TALBOT, G. (Ed.). Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products. Boca Raton: CRC Press, 2009. Chapter 10, p. 185-210.

Eletrônicos:

TAMPAS de elastômeros: testes funcionais. In: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. cap. 6, p. 294-299. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf)> . Acesso em: 22 mar. 2012.

- Teses, dissertações e trabalhos de conclusão de curso

AUTOR. Título (em negrito). Ano de defesa. Número de folhas. Categoria (Grau e área) - Unidade da Instituição, Instituição, Cidade, Data de publicação.

Exemplo:

CARDOSO, C. F. Avaliação do sistema asséptico para leite longa vida em embalagem flexível institucional do tipo Bag-in-box. 2011. 160 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

- Publicação periódica (Artigos de periódicos)

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. Título do Periódico (por extenso e negrito), Local de publicação (cidade), volume, número, páginas inicial-final, ano de publicação.

Exemplo:

Impressos:

KOMITOPOULOU, Evangelia; GIBBS, Paul A. The use of food preservatives and preservation. *International Food Hygiene*, East Yorkshire, v. 22, n. 3, p. 23-25, 2011.

Eletrônicos:

INVIOLÁVEL e renovável. *Embalagem Marca*, São Paulo, v. 14, n. 162, p. 26, fev. 2013. Disponível em: <<http://issuu.com/embalagemmarca/docs/em162/26>>. Acesso em: 20 maio 2014.

- Trabalho apresentado em evento

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

AUTOR. Título do trabalho apresentado, seguido da expressão In: NOME DO EVENTO, numeração do evento (se houver), ano e local (cidade) de realização. Título do documento (anais, proceedings, atas, tópico temático, etc.), local: editora, data de publicação. Página inicial e final da parte referenciada.

Exemplos:

Impressos

ALMEIDA, G. C. Seleção classificação e embalagem de olerícolas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA, 2., 2007, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV, 2007. p. 73-78.

IUFOST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHEMICAL CHANGES DURING FOOD PROCESSING, 1984, Valencia. Proceedings... Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 1984.

Eletrônicos

MARTARELLO, V. D. Balanço hídrico e consumo de água de laranjeiras. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2011, Campinas. Anais... Campinas: IAC; ITAL, 2011. 1 CD-ROM.

LUIZ, M. R.; AMORIN, J. A. N.; OLIVEIRA, R. Bomba de calor para desumificação e aquecimento do ar de secagem. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 8., 2007, Cusco. Anais eletrônicos... Cusco: PUCP,

2007. Disponível em: <<http://congresso.pucp.edu.pe/cibim8/pdf/06/06-23.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2011.

- Normas técnicas

ÓRGÃO NORMALIZADOR. Número da norma (em negrito): título da norma. Local (cidade), ano. nº de páginas.

Exemplos:

ASTM INTERNATIONAL. D 5047-09: standard specification for polyethylene terephthalate film and sheeting. Philadelphia, 2009. 3 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15963: alumínio e suas ligas - chapa lavrada para piso - requisitos. Rio de Janeiro, 2011. 12 p.

- Legislação (Portarias, decretos, resoluções, leis)

Jurisdição (ou cabeçalho da entidade, no caso de se tratar de normas), título, numeração, data e dados da publicação.

Exemplos:

Impressos

BRASIL. Medida provisória no 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Seção 1, p. 29514.

Eletrônicos

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) n. 202/2014, de 03 de março de 2014. Altera o Regulamento (UE) n. 10/2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, L 62, 04 abr.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

2014. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2014:062:0013:0015:PT:PDF>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

#### **4. PROCESSO DE AVALIAÇÃO**

O manuscrito submetido à publicação no BJFT é avaliado previamente por um Editor e, dependendo da qualidade geral do trabalho, nesta etapa pode ser rejeitado ou retornar aos autores para adequações ou seguir para revisão por dois Revisores ad hoc. Todo o processo de revisão por pares é anônimo (double blind

review). Os pareceres dos revisores são enviados para o Editor Associado, que emite um parecer para qualificar a pertinência de publicação do manuscrito. Caso haja discordância entre os pareceres, outros Revisores poderão ser consultados. Quando há possibilidade de publicação, os pareceres dos revisores e do Editor Associado são encaminhados aos Autores, para que verifiquem as recomendações e procedam às modificações pertinentes. As modificações feitas pelos autores devem ser destacadas no texto em cor diferente. Não há limite para o número de revisões, sendo este um processo interativo cuja duração depende da agilidade dos Revisores e do Editor em emitir pareceres e dos Autores em retornar o artigo revisado. No final do processo de avaliação, cabe ao Editor Chefe a decisão final de aprovar ou rejeitar a publicação do manuscrito, subsidiado pela recomendação do Editor Associado e pelos pareceres dos revisores. Este sistema de avaliação por pares é o mecanismo de auto regulação adotado pela Revista para atestar a credibilidade das pesquisas a serem publicadas.

Quando o trabalho apresentar resultados de pesquisa envolvendo a participação de seres humanos, em conformidade a Resolução nº 466 de 12 de outubro de 2012, publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Saúde, informar o número do processo de aprovação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa.

A avaliação prévia realizada pelos Editores considera: Atendimento ao escopo e às normas e da revista; Relevância do estudo; Abrangência do enfoque; Adequação e reprodutibilidade da metodologia; Adequação e atualidade das referências bibliográficas e Qualidade da redação.

A avaliação posterior por Revisores e Editores/Conselheiros considera originalidade, qualidade científica, relevância, os aspectos técnicos do manuscrito, incluindo adequação do título e a qualidade do Resumo/Summary, da Introdução, da Metodologia, da Discussão e das Conclusões e clareza e objetividade do texto.

Submissão de manuscritos

A submissão do artigo deve ser online, pelo sistema ScholarOne, acessando no link:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjft-scielo>

Caso não seja usuário do ScholarOne, crie uma conta no sistema via Create an Account na tela de Log in. Ao criar a conta, atente para os campos marcados com

\*req.\* pois são obrigatórios. Caso já seja usuário mas esqueceu a senha, utilize o Reset Password na mesma tela.

Caso tenha dúvidas na utilização do sistema use o tutorial (Resources - User Tutorials) abaixo do Log in. Caso necessite de ajuda use o Help no cabeçalho da página, à extrema direita superior.

Durante a submissão, não usar o botão back do navegador.

Uma carta de apresentação (cover letter) do manuscrito deve ser submetida online via ScholarOne, descrevendo a hipótese/mensagem principal do trabalho, o que apresenta de inédito, a importância da sua contribuição para a área em que se enquadra e sua adequabilidade para a revista Brazilian Journal of Food Technology.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

O Termo de Responsabilidade ([http://bjft.ital.sp.gov.br/instrucao\\_autores.php](http://bjft.ital.sp.gov.br/instrucao_autores.php)) deve ser submetido online via ScholarOne, juntamente com os demais arquivos, no item File upload, como “Supplemental file NOT for Review”.

Caso não seja possível reunir as assinaturas de todos os autores em um só Termo, cada autor pode enviar seu Termo de Responsabilidade devidamente preenchido e assinado para a Secretaria da Revista ([bjftsec@ital.sp.gov.br](mailto:bjftsec@ital.sp.gov.br)). Vale ressaltar que a submissão não será considerada finalizada, caso algum dos autores não envie o Termo de Responsabilidade.