



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2018

Sara Filipa da Rocha Oliveira **Avaliação das características organolépticas, químicas e microbiológicas de carne de porco após suplementação da dieta do animal**

Evaluation of the organoleptic, chemical and microbiological characteristics of pork meat after diet supplementation



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2018

Sara Filipa da Rocha Oliveira **Avaliação das características organolépticas, químicas e microbiológicas de carne de porco após suplementação da dieta do animal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Lopes da Silva, Professor Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Engenheiro Nuno Guedes, técnico comercial da D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA.

Dedico o presente trabalho aos meus pais, irmão e à Cláudia, pela força e apoios incansáveis ao longo do meu percurso académico.

O Júri

Presidente	Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
Orientador	Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
Arguente	Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

O nervosismo que senti no dia em que pisei o campus da UA regressa novamente a mim. A ânsia pelo novo, pelo desconhecido, por aquilo que me faz crescer começa novamente. Contudo, sei que não estou sozinha, comigo tenho os meus queridos pais e o meu fantástico irmão que, em rigorosamente tudo, me apoiam e, em tudo me incentivam sempre a procurar o melhor de mim.

Jorge, a ti que és o meu ídolo, a ti que és pessoa mais perfeccionista que conheço, a ti que me ouves, um enorme obrigada. A ti, com especial carinho, dedico este trabalho.

Cláudia, um obrigada muito especial a ti por seres esse ser humano fantástico e que tanto me inspira. Quero também, agradecer ao meu super padrinho que cuida de mim como ninguém cuida. Tia Lina, Renato, obrigada!

Margarida, Joana e Fátima, as minhas engenheiras, a vocês nunca serão suficientes as palavras de gratidão que poderei expressar.

Leandro, a ti, pela paciência e companheirismo, a ti, porque és de verdade.

Ao Professor Doutor José António Lopes da Silva deixo uma nota de especial apreço. Agradeço-lhe o acompanhamento e dedicação, agradeço-lhe a calma que me ensinou a ter e a forma como me fez aprender.

Ao Engenheiro Nuno Guedes agradeço a fantástica oportunidade. A si deixo um obrigada enorme pelas oportunidades, conversas e conselhos, levarei todos comigo!

Palavras chave

Mega Sense, qualidade organolética, oxidação, músculo *longissimus*, carne de porco

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito do *Mega Sense*, um produto tecnológico e inovador, na carne de porco fresca, congelada e cozinhada e ainda em produtos que desta derivam, como por exemplo, o lombo curado. O *Mega Sense* propõe-se, essencialmente, quando introduzido na dieta dos animais, a antagonizar os processos oxidativos que decorrem na carne, após abate do animal, e que são prejudiciais à qualidade nutricional e organolética. É esperada uma ação direta do produto na carne de porco, visto que o animal é monogástrico, logo, a dieta a que é submetido reflete-se nas características do músculo. Assim, em costeletas do músculo *longissimus*, foram efetuados vários ensaios, mediante as normas em vigor no presente ano civil, de forma a determinar o pH e atividade da água. O perfil lipídico, avaliado através de GC-FID, o grau oxidativo, determinado por TBARS, e a cor, avaliada através de colorimetria pelo método CIE L*a*b*, foram também estudados. Estes ensaios foram efetuados na presença e ausência do produto na alimentação, de forma a perceber se as diferenças desejadas são estatisticamente significativas. Adicionalmente a este primeiro objetivo foi iniciado um outro que visa a validação, para posterior acreditação do método aplicado para a determinação do perfil lipídico através de cromatografia gasosa. O pH, a a_w e a humidade apresentaram valores superiores na presença do *Mega Sense* na dieta, porém, a diferença não se verificou para as amostras de lombo curado. O grau oxidativo, avaliado via TBARS, foi menor na presença deste suplemento alimentar, para todas as amostras analisadas, evidenciando-se a atividade antioxidante do produto. Relativamente ao perfil lipídico, o papel do suplemento alimentar foi, em parte, concordante com os resultados obtidos na avaliação do grau oxidativo. Quanto ao processo de validação foram

realizadas apenas as curvas de calibrações e avaliada a sua linearidade. No presente trabalho evidenciou-se a capacidade antioxidante do *Mega Sense*, sobre alguns parâmetros qualitativos, embora seja necessário o aprofundamento do seu estudo, nomeadamente, quais os mecanismos de ação responsáveis por esses efeitos. Relativamente ao processo de validação, encontra-se ainda numa fase preliminar; realizaram-se ensaios preliminares que envolveram a obtenção de curvas de calibração e a análise de linearidade.

Keywords

Mega Sense, organoleptic quality, oxidation, *longissimus* muscle, pork

Abstract

The objective of the present work is to analyse the effect of Mega Sense, a technological and innovative product, on fresh, frozen and cooked pork and also, products derived from it, such as cured loin. Mega Sense is mainly intended to antagonize the oxidative processes that occur in the meat, after slaughtering the animal, and that are very harmful to the nutritional quality and, especially to the organoleptic quality. A direct action of the product on pork is expected since the animal is monogastric soon, the diet to which it is subjected is reflected in the characteristics of muscle. Thus, on *longissimus* muscle ribs, several tests were carried out, in accordance with the norms of the current calendar year, to determine the pH, water activity. The lipid profile, evaluated by GC-FID, the oxidative degree, determined by TBARS and color, evaluated by colorimetry using the CIE method $L^* a^* b^*$, were also studied. These tests were carried out in the presence and absence of the product in the feed, to see if the desired differences are statistically significant. In addition to this first objective, a new study was initiated to achieve the validation of the method used to determine the lipid profile through gas chromatography. The pH, a_w and humidity presented higher values in the presence of Mega Sense in the diet, however, no difference was observed for samples of cured loin. The oxidative grade, evaluated via TBARS, was lower in the presence of this food supplement, for all the analyzed samples, evidencing the antioxidant activity of the product- Regarding the lipid profile, the role of the dietary supplement was in part concordant with the results obtained in the evaluation of the oxidative grade. As for the validation process, only the calibration curves were performed and their linearity

evaluated. In the present work the antioxidant capacity of Mega Sense was evidenced, on some qualitative parameters, although it is necessary to deepen its study, namely, which mechanisms of action are responsible for these effects. In relation to the validation process, it is still at a preliminary stage; preliminary tests involving calibration curves and linearity analysis were performed.

Índice

Índice de Figuras	I
Índice de Tabelas.....	II
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	IV
Capítulo 1 e 2 - Introdução.....	1
1. Empresa de acolhimento	2
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Qualidade da carne - Contextualização	3
2.2. Carne de porco – uma visão geral	4
2.2.1. Aspetos estruturais do músculo da carne de porco.....	5
2.2.2. Constituição e características do músculo longissimus.....	7
2.2.3. Reações postmortem e a qualidade da carne	8
2.2.4. Influência da raça na qualidade da carne.....	10
2.3. Processos oxidativos e a sua contribuição para a perda de qualidade	13
2.3.1. Reações Oxidativas – Mecanismo de ação.....	14
2.3.2. Ambiente oxidativo na carne de porco.....	15
2.3.3. Impacto da oxidação a nível lipídico.....	15
2.3.4. Cor: um parâmetro crucial na qualidade da carne	19
2.3.4.1. Mioglobina	20
2.3.4.2. Influência da dieta na cor	21
2.3.4.3. Variações no pH e a qualidade da carne – influência na cor	22
2.3.5. Atividade da água e a qualidade da carne	23
2.3.6. Qualidade da carne: o sabor	24
2.3.7. Qualidade da carne: tenrura.....	25
2.4. Manipulação da dieta: uma solução promissora?.....	26
2.4.1. Efeitos de fontes da dieta de ω -3 nas razões ω -6/ ω -3 e AGs polinsaturados/AGs saturados (P/S)	28
2.4.2. Mega Sense: uma proposta para o aumento da qualidade da carne e processados	29
2.5 Validação e acreditação do método de ensaio aplicado para a determinação de ácidos gordos em matrizes alimentares variadas	32
2.5.1. Cromatografia gasosa acoplada ao detetor por ionização de chama	32
2.5.1.1. Constituição do aparelho de GC-FID	33
2.5.1.1.1. Injetor split/splitless	33
2.5.1.1.2. Coluna – Fase estacionária	33
2.5.1.1.3. Detetor por ionização da chama – FID.....	34
2.5.1.2. Teoria dos pratos teóricos.....	35

2.5.1.2.1.	Equação de Van Deemter	36
2.5.2.	Análise de ácidos gordos	38
2.5.3.	Validação da análise cromatográfica do perfil lipídico de várias matrizes alimentares	42
2.5.3.1.	Descrição do método interno de trabalho	42
2.5.3.2.	Determinação da especificidade e seletividade	42
2.5.3.3.	Curva de calibração	43
2.5.3.4.	Estabelecimento da gama de trabalho	44
2.5.3.5.	Linearidade	44
2.5.3.6.	Limites analíticos de um método de ensaio	45
2.5.3.6.1.	Limite de deteção (L.D.)	45
2.5.3.6.2.	Limite de Quantificação	46
2.5.3.7.	Sensibilidade	46
2.5.3.8.	Precisão	47
2.5.3.8.1.	Repetibilidade	47
2.5.3.8.2.	Reprodutibilidade	48
2.5.3.8.3.	Precisão intermédia	48
2.5.3.9.	Exatidão	49
2.5.3.9.1.	Materiais de referência certificados	49
2.5.3.9.2.	Ensaio interlaboratoriais	50
2.5.3.9.3.	Controlo de rotina	50
Capítulo 3 –	Enquadramento do trabalho	51
Objetivos do trabalho a realizar		52
Capítulo 4 –	Material e métodos	53
4.1	Processo de obtenção das amostras	54
4.2.	Classificação e identificação de carnes e produtos cárneos	54
4.3.	Preparação das amostras para posterior análise	55
4.4.	Medição do pH em carnes frescas e lombos curados	55
4.5.	Determinação da atividade específica da água (a_w)	55
4.6.	Determinação do teor de humidade	56
4.7.	Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)	56
5.6.	Análise da cor através do método CIE $L^*a^*b^*$	57
4.9.	Análise do perfil lipídico com recurso a GC-FID	57
1.1.	Preparação dos ésteres de metilo para análise	57
4.9.1.1.	Preparação da amostra para análise – Hidrólise ácida	57
4.9.1.2.	Determinação do teor de matéria gorda livre	58

4.9.1.3.	Preparação dos ésteres de metilo para análise GC-FID.....	58
4.10.	Avaliação microbiológica do lombo curado.....	59
4.10.1.	Preparação das amostras.....	59
4.10.2.	Contagem de Microrganismos totais.....	59
4.10.3.	Deteção, enumeração e confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i>	60
4.10.4.	Deteção e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
4.10.5.	Quantificação de Bolores e Leveduras.....	61
4.10.6.	Deteção de <i>Salmonella</i>	61
4.10.7.	Deteção e quantificação de <i>Escherichia coli</i>	61
Capítulo 5 –	Resultados e discussão.....	62
5.1.	Alimentação com o Mega Sense.....	63
5.2.	Efeito da alimentação com Mega Sense sobre a cor da carne.....	63
5.3.	Efeito da incorporação do Mega Sense na dieta sobre o pH da carne.....	70
5.4.	Efeito da integração do Mega Sense na dieta sobre a atividade da água e a humidade.....	74
5.5.	Análise microbiológica e efeito da incorporação do Mega Sense na dieta.....	77
5.6.	Efeito da integração do Mega Sense na dieta sobre o ambiente oxidativo.....	83
5.7.	Efeito da suplementação do Mega Sense na dieta sobre o perfil lipídico.....	89
5.8.	Validação preliminar com vista à acreditação do método de ensaio aplicado para a determinação de ácidos gordos em matrizes alimentares variadas.....	95
5.8.1.	Caracterização do cromatograma do FAME Mix utilizado como padrão de identificação para as análises cromatográficas.....	95
5.8.2.	Quantificação.....	97
5.8.2.1.	Curvas de calibração e avaliação da linearidade.....	97
Capítulo 6 –	Conclusão e diretrizes futuras.....	100
Capítulo 7 –	Bibliografia.....	103
Capítulo 8–	Anexos.....	112
Anexo 1 –	Composição dos meios utilizados para as análises microbiológicas.....	113
Anexo 2 –	Lombo curado: concentração de malondialdeído – continuação da tabela de resultados 4.....	116
Anexo 3 –	Cromatogramas obtidos para todas as amostras de lombo curado analisadas na ausência de Mega Sense.....	117

Índice de Figuras

Figura 1.	Constituição detalhada da estrutura muscular.....	6
Figura 2.	Na imagem encontra-se um exemplar de cada uma das raças usadas para cruzamento, Pietran, Landrace e Large White, respectivamente	10
Figura 3.	Exemplar da raça de porco bísaro numa produção em ambiente aberto.....	11
Figura 4.	Representação generalizada da ação anti e prooxidante sobre células do músculo liso.	14
Figura 5.	Etapas da peroxidação lipídica.....	18
Figura 6.	Reação de Fenton.....	21
Figura 7.	Esquema representativo da ação do <i>Mega Sense</i> em vários parâmetros associados à qualidade da carne.....	30
Figura 8.	1 - Representação gráfica da equação de Van Deemter; 2 – Representação gráfica das equações de Van Deemter para três tipos de gás de arraste, o N ₂ , o He e o H ₂	37
Figura 9.	Comparação do parâmetro a* na ausência e na presença do <i>Mega Sense</i> entre várias amostras.....	65
Figura 10.	Comparação do parâmetro L* na ausência e na presença do <i>Mega Sense</i> entre várias amostras.....	66
Figura 11.	Comparação do parâmetro b* na ausência e na presença do <i>Mega Sense</i> entre várias amostras.....	67
Figura 12.	Variação do pH na presença e ausência de <i>Mega Sense</i> nas diferentes gamas de amostras.....	70
Figura 13.	Auto-oxidação da mioglobina.....	72
Figura 14.	Comparação dos obtidos quer para a atividade da água quer para a humidade, na presença e ausência do produto.....	75
Figura 15.	Avaliação da incidência da peroxidação lipídica no músculo longissimus de carne de porca, através do método TBARS.....	83
Figura 16.	Variação do ambiente oxidativo ao longo do tempo.....	87
Figura 17.	Cromatogramas obtidos na análise do perfil lipídico para amostras de lombo curado.....	90
Figura 18.	Análise comparativa da razão de saturados/insaturados.....	91
Figura 19.	Quantidade de ácido linoleico em todas as gamas de amostras.....	92

Figura 20.	Identificação dos picos obtidos para o mix padrão com 37 ácidos gordos, numa concentração de 0,02 µg/µL.....	95
Figura 21.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_1.....	117
Figura 22.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_2.....	117
Figura 23.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_3.....	118
Figura 24.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_4.....	118
Figura 25.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_5.....	118
Figura 26.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_6.....	119
Figura 27.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_7.....	119
Figura 28.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_8.....	119
Figura 29.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_9.....	120
Figura 30.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_10.....	120
Figura 31.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_11.....	120
Figura 32.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_12.....	121
Figura 33.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_13.....	121
Figura 34.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_14.....	121
Figura 35.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_15.....	122
Figura 36.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_16.....	122
Figura 37.	Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_17.....	122

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Principais vertentes associadas à qualidade da carne.....	3
-----------	---	---

Tabela 2.	Suporte bibliográfico que sustenta a potencialidade antioxidante de extratos naturais de plantas.....	31
Tabela 3.	Prós e contras na escolha do gás de arraste.....	38
Tabela 4.	Parâmetros L*, a*, b* obtidos através do método CIE para amostras de carne refrigerada, congelada e cozinhada, na presença e ausência do <i>Mega Sense</i>	68
Tabela 5.	Análise microbiológica do lombo curado na presença e ausência do <i>Mega Sense</i> , com comparação dos valores de pH, a _w e humidade, para um intervalo de 95% de confiança.....	80-82
Tabela 6.	Determinação da concentração de malondialdeído (mg de malondialdeído/ 1000 g de amostra) para as diferentes amostras na presença e ausência do <i>Mega Sense</i> , para um intervalo de 95% de confiança.....	86
Tabela 7.	Comparação da quantidade de ácido linolénico para todos os grupos de amostras, na presença e ausência de <i>Mega Sense</i> , para um intervalo de confiança de 95% na análise <i>t-student</i>	93
Tabela 8.	Caracterização dos ácidos gordos obtidos para o FAME Mix analisado, com discriminação da cadeia carbonada, nomenclatura e tempo de retenção (minutos) respetivos.....	95-96
Tabela 9.	Equação da reta de calibração obtida para cada um dos ácidos gordos assim como, os r e r ² e ainda, o teste de Rikilt.....	97-98
Tabela 10.	Constituição do meio de cultura PSA.....	113
Tabela 11.	Constituição do meio de cultura Half-Fraser.....	113
Tabela 12.	Constituição do meio de cultura Baird – Parker.....	113
Tabela 13.	Constituição do meio de cultura Brain – Heart.....	114
Tabela 14.	Constituição do meio de cultura DG18.....	114
Tabela 15.	Constituição do meio de cultura MSRV.....	114
Tabela 16.	Constituição do meio de cultura TBX.....	115
Tabela 17.	Tabela complemento dos valores obtidos na determinação da concentração de malondialdeído (mg de malondialdeído/ 1000 g de amostra) para as amostras de lombo curado na presença e ausência do <i>Mega Sense</i> , para um intervalo de 95% de confiança.....	116

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ADP	Adenosina difosfato
<i>a_w</i>	Atividade da água
AGs	Ácidos gordos
ARA	Ácido araquidónico
ATP	Adenosina trifosfato
CCPA	<i>Conseils et compétences en Productions Animales</i>
CFU	Unidades formadoras de colónias
DFD	Carne dura, escura e seca
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
D.I.N.	Desenvolvimento e Inovação Nutricional
DMB	Desoximioglobina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EN	Normas Europeias
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detetores de ionização por chama
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEC	Comissão eletrotécnica internacional
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
L.I.D.	Laboratório de Inovação e Desenvolvimento
MetMB	Metamioglobina
Mos	Microrganismos
MS	Espectrometria de massa
NIR	Espectroscopia de infravermelho próximo
NP	Normas Portuguesas
OMB	Oximioglobina
PSE	Carne mole, pálida e exsudativa
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados

RNS	Espécies Reativas de Nitrogénio
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triacilglicerídeos

Capítulo 1 e 2 - Introdução

1. Empresa de acolhimento

A D.I.N., Desenvolvimento e Inovação Nutricional S.A., é uma empresa direcionada para a nutrição animal, cujo principal foco é o constante desenvolvimento de novas metodologias, ideias e estratégias que proporcionem o progresso na área e o consequente destaque da empresa. Recentemente, à semelhança da *Ibersan*, passou a integrar o grupo francês CCPA, *Conseils et Compétences en Productions Animales*, uma vasta empresa com grande impacto a nível europeu no setor da nutrição animal, possuindo várias delegações em diversos países.

A sede da empresa situa-se no Parque Industrial da Catraia, freguesia do Couto do Mosteiro no concelho de Santa Comba Dão. Aqui, as instalações dividem-se numa unidade fabril que visa a produção de alimentos para animais, nomeadamente, rações, pré-misturas, alimentos de iniciação, matérias primas e diversas especialidades para várias espécies animais e num laboratório de desenvolvimento e investigação, dedicado à inovação e crescimento em áreas como a nutrição animal, onde a atenção é direcionada para o desenvolvimento de formulações e farmacêuticos que solucionem exigências biológicas durante o crescimento do animal. O L.I.D., laboratório de inovação e desenvolvimento, cuja competência técnica foi reconhecida pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, visa uma alargada área de serviços de investigação e análise direcionados sobretudo para a alimentação animal, indústria alimentar e farmacêutica e ainda a análise de águas residuais. Com equipamento atualizado este laboratório consegue aliar-se à investigação científica promovendo o avanço e expansão de conhecimentos, fornecendo aos clientes a alternativa que melhor se adequa às suas exigências, contribuindo deste modo, para o seu crescimento. O domínio de diversas técnicas como o HPLC, GC-FID, absorção atómica, NIR, ELISA, Duma, etc, permite o destaque e a disponibilização da empresa para ensaios físico-químicos e microbiológicos.

2. Revisão Bibliográfica

Atendendo aos objetivos e ao trabalho realizado durante o estágio na empresa DIN S.A. no âmbito deste projeto de mestrado, os quais envolveram não só a avaliação do impacto de um aditivo alimentar na qualidade da carne de porco e derivados, mas também, o processo de validação para posterior acreditação da metodologia usada para determinação do perfil lipídico, via GC-FID. A revisão bibliográfica que se segue aborda

a revisão do estado da arte relativamente às propriedades qualitativas da carne de porco e as possíveis alterações provocadas por alterações na dieta e ainda, à cromatografia gasosa com detetor por ionização de chama e os requisitos imprescindíveis à validação da metodologia aplicada.

2.1. Qualidade da carne - Contextualização

A qualidade da carne é, atualmente, um conceito bastante amplo, que abrange um complexo e alargado conjunto de critérios, tabela 1, que se inter-relacionam em várias relações causa-efeito. Do ponto de vista químico e bioquímico, este conceito implica parâmetros como: valor nutricional, composição, nomeadamente o teor lipídico e, ainda, estabilidade oxidativa.¹ Quanto à vertente tecnológica, a qualidade inclui parâmetros como o tempo de prateleira, a sua transformação nos mais diversos derivados, textura e capacidade de retenção de água.

Tabela 1 - Principais vertentes associadas à qualidade da carne

<i>Vertente:</i>	<i>Parâmetro:</i>
Segurança	<ul style="list-style-type: none"> • Fatores extrínsecos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Microrganismos patogénicos ➤ Contaminantes residuais • Fatores intrínsecos: <ul style="list-style-type: none"> ➤ a_w ➤ pH
Química e Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Valor nutricional • Composição: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Lipídica ➤ Muscular • Reservas energéticas.
Tecnológica	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de retenção de água • Tempo de prateleira • Consistência e textura
Sensorial	<ul style="list-style-type: none"> • Aspeto físico: <ul style="list-style-type: none"> • Cor • Forma • Tamanho • No momento de prova: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tenrura ➤ Suculência ➤ Sabor

Porém, estas condicionantes da qualidade são também afetadas pelas circunstâncias em que a carne é produzida como sistemas de gestão, raça, genótipo, alimentação, tratamento do animal antes, durante e após o abate, onde se inclui a metodologia usada, arrefecimento da carcaça e o seu conseqüente armazenamento.² A progressão da carne, incluindo as condições que antecedem o processo de conversão músculo-carne, na cadeia de distribuição cujo percurso se inicia nos processadores, passa pelos retalhistas e termina nos consumidores, implica a garantia de qualidade em todas as etapas, algo que apresenta custos associados que poderão ser elevados. Uma vez que o consumidor é cada vez mais informado e ativo exigindo ao mercado carnes, e respetivos derivados, de qualidade superior.³ A demanda do consumidor pela alta qualidade da carne influencia a sua decisão no momento de compra. Numa primeira fase de análise o consumidor avalia aspetos visuais como a cor e o nível de gotejamento da peça que pretende comprar. Apesar do comprador relacionar os parâmetros mencionados anteriormente, com a frescura da carne, este só adquire o produto com maior frequência se aspetos como sabor e suculência se destacarem dos demais produtos disponíveis no mercado.⁴

Na indústria de produção e processamento suína é cada vez mais assente a necessidade de desenvolvimento de carne de qualidade superior, com valores nutricionais melhorados, isto porque, existem alternativas viáveis ao seu consumo, como a carne de frango ou recursos de origem vegetal que se encontram disponíveis em larga escala e de forma mais económica.⁵ Surge, deste modo, uma problemática em relação à manutenção da carne de porco num lugar de destaque no mercado, o que torna crucial o estudo e desenvolvimento de metodologias alternativas que promovam uma carne de qualidade quer organolética, quer nutricional.⁶ No presente trabalho, é avaliada a manipulação da dieta como forma de melhoramento de vários parâmetros qualitativos na carne, através de uma diminuição do ambiente oxidativo. Todavia, um conhecimento prévio da composição muscular, da raça e dos acontecimentos durante o processo *postmortem* é importante para uma melhor compreensão do estudo realizado.

2.2. Carne de porco – uma visão geral

Atualmente, a carne desempenha um papel de relevo na dieta surgindo como uma fonte de proteína de qualidade, minerais essenciais, como o ferro e o zinco e de vitaminas, nomeadamente vitaminas do complexo B. A carne é a principal fonte de gordura da dieta,

sobretudo para a sociedade Ocidental, na qual se inclui Portugal, onde, conseqüentemente, a ingestão de ácidos gordos saturados ocorre em elevada quantidade, fator este que, se torna potencialmente prejudicial, podendo levar, por exemplo, ao desenvolvimento de doenças cardio-vasculares.⁷ Contudo, a preocupação e procura do consumidor por alimentos saudáveis e que contribuam favoravelmente para a sua saúde tem aumentado exponencialmente, revelando-se esta tendência comportamental, por exemplo, através da procura pela ingestão de carne com baixo teor de gordura saturada.³ Atualmente, em Portugal são escassas as tentativas para que a carne de porco se torne rica nutricionalmente, assim, um dos principais objetivos a que o *Mega Sense* se propõe é o de contrariar esta tendência, este que consiste numa formulação desenvolvida pelo grupo francês CCPA e que conjuga três grupos de compostos naturais, os taninos, compostos fenólicos e α -tocoferol. Assim o desígnio deste produto é reduzir o ambiente oxidativo, e aumentar o teor de ácidos gordos em ω -3 e -6 não oxidados, através da proteção dos ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) presentes na carne que, tendencialmente, sofrem oxidação, acontecimento que resulta na sua degradação.

2.2.1. Aspetos estruturais do músculo da carne de porco

O músculo, presente no animal vivo, é constituído por fibras longas, paralelas e cilíndricas, como é possível verificar na figura 1. Cada fibra é uma célula multinucleada, constituída por miofibrilas, também com formato cilíndrico, cuja constituição consiste maioritariamente em proteínas, responsáveis pelos processos de contração, e água.⁸ Cada fibra está rodeada por uma camada de tecido conjuntivo, o endomísio, o conjunto de fibras musculares origina o fascículo, rodeado pelo perimísio, e o conjunto de fascículos resulta no músculo, por exemplo, no músculo esquelético, sendo este também rodeado por uma camada de tecido conjuntivo, o epimísio.⁶ Assim, a maioria dos músculos consiste numa mistura heterogénea de fibras, com tamanhos e cor variáveis, sendo este último parâmetro dependente do conteúdo de mioglobina presente. Os músculos podem similarmente, diferir ao nível do seu metabolismo energético, composição lipídica e mitocondrial e ainda na densidade capilar que apresentam.⁹ As fibras podem ser classificadas mediante alguns parâmetros, como: a cor ou a velocidade de contração, podendo ser denominadas por vermelhas, brancas ou intermédias ou, fibras de contração lenta ou rápida, respetivamente.⁸

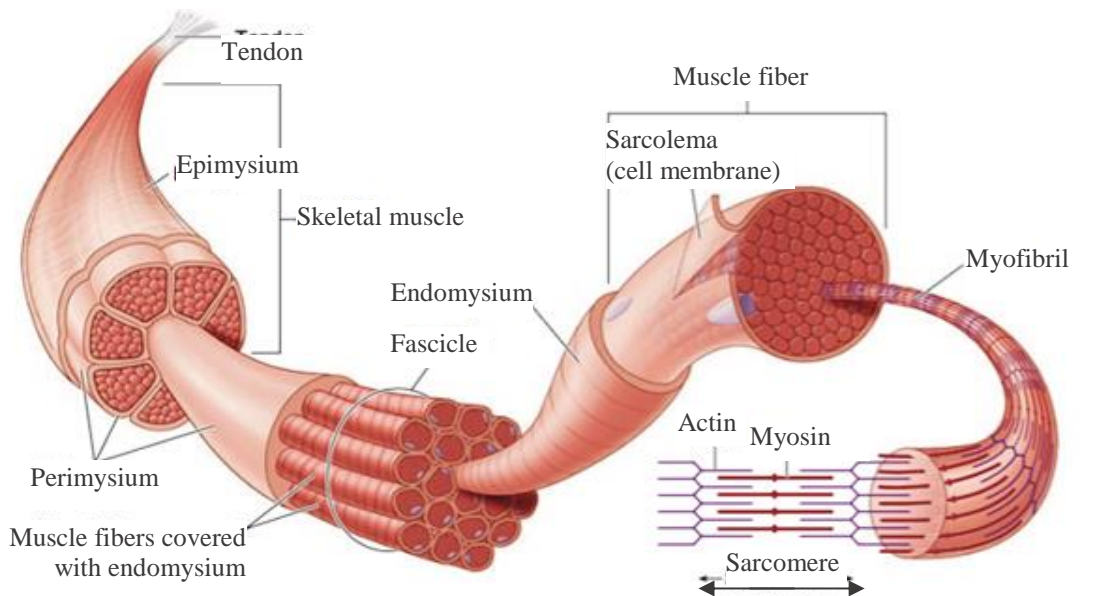


Figura 1 - Constituição detalhada da estrutura muscular. Cada fibra é uma célula multinucleada, constituída por miofibrilas, com formato cilíndrico, cuja constituição consiste maioritariamente em proteínas contráteis, como a miosina e a actina que se encontram no sarcômero, e água.⁸ Cada fibra é rodeada por uma camada de tecido conjuntivo, o endomísio, o conjunto destas origina o fascículo, que é rodeado pelo perimísio, e o conjunto de fascículos resulta no músculo. (imagem adaptada do livro 'Clinically Oriented Anatomy')⁶

Relativamente à classificação das fibras face à rapidez com que contraem estas são distinguidas entre si com base no seu metabolismo, existindo, deste modo, fibras de contração lenta oxidativa e fibras de contração rápida glicolítica ou oxidativa. É ainda possível estabelecer uma relação entre a cor e o metabolismo que as fibras apresentam, as vermelhas correspondem a fibras de contração lenta oxidativas, as brancas a fibras de contração rápida glicolítica e as intermédias a fibras de contração rápida glicolítica ou oxidativa.⁶

As fibras vermelhas, que se encontram em maior proporção na carne de porco, são, tipicamente, as mais pequenas e vermelhas, estando esta última característica relacionada com a maior concentração de mioglobina presente e com a elevada predominância mitocondrial, culminando assim, num metabolismo essencialmente oxidativo. O processo metabólico associado a estas fibras é aeróbico, o que torna a presença de oxigénio fundamental para a produção de energia nestes locais.¹⁰ Contrariamente, as fibras brancas são, comumente, mais largas, e possuem menor abundância de mioglobina, conteúdo lipídico, capilares e mitocôndrias, estas últimas que, devido à sua baixa atividade conferem um metabolismo anaeróbico/glicolítico a este tipo de fibras.¹¹

As diferenças na capacidade metabólica dos dois tipos de fibras estão relacionadas, não só com a presença de isoformas específicas de proteínas contráteis, como por exemplo, cadeias leves e pesadas de miosina, proteínas reguladoras, mas também com a velocidade de contração, anteriormente mencionada, padrões de inervação do próprio músculo e propriedades mecânicas que este possui.¹² As fibras vermelhas surgem com um turnover lento de ATP, conseguindo, portanto, permanecer ativas durante longos períodos, já as fibras brancas surgem com um turnover mais rápido, esgotando rapidamente as suas reservas, o que leva a que a sua atividade prevaleça durante menores períodos de tempo.⁶

2.2.2. Constituição e características do músculo *longissimus*

A carne de porco, como mencionado previamente, caracteriza-se pela sua cor vermelha, devido ao elevado teor de mioglobina em conjunto com uma maior proporção de fibras vermelhas, ricas em mitocôndrias, e, portanto, com um metabolismo aeróbico prevalecente, que poderá manifestar-se em taxas oxidativas elevadas. Esta é detentora de um perfil de ácidos gordos bastante característico, que se mantém constante, mesmo com a variação da raça e do sexo, possuindo quantidades substanciais de ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1).¹³ O centro do músculo *longissimus*, contém, tipicamente, 1% do total de lípidos presentes no músculo do porco. Relativamente ao ácido linolénico (18:3), que é um ácido gordo ómega 3, este surge em pouquíssimas quantidades, quando comparado com o ácido linoleico (18:2), o qual é o ácido gordo ómega 6 mais comum na carne de porco, o que resulta, tipicamente, numa razão ω -6/ ω -3 bastante elevada, algo que não é favorável à qualidade nutricional do alimento.¹⁴ O ácido linoleico deriva essencialmente da dieta do animal, percorre o seu sistema digestivo e já no intestino delgado é absorvido para a corrente sanguínea, onde é transportado para os tecidos do animal, esta incorporação é maior nos animais monogástricos, como o porco, do que em animais ruminantes, como a vaca.¹⁵ Já o ácido linolénico pode derivar quer da dieta do animal, quer da ação de elongases e dessaturases que atuam sobre o ácido linoleico, acrescentando-lhe uma insaturação. Esta atividade enzimática pode também ocorrer em ácidos gordos com 20 carbonos, onde, conseqüentemente se dá a adição de várias insaturações.¹⁶ A percentagem de ácido linoleico (18:2 ω -6) presente nos fosfolípidos do músculo *longissimus* é superior à percentagem dos triacilglicerídeos, facto que deriva da elevada presença deste ácido na dieta do animal. Os ómeas 3 de cadeia

longa (C20-C22) ocorrem em baixas concentrações na gordura subcutânea, porém a sua presença no músculo de ruminantes é vestigial, o que reflete que a deposição, ainda que pequena, é favorável nos TAG dos animais monogástricos. Relativamente à relação do sexo com a quantidade dos PUFAs, os machos tendem a apresentar concentrações maiores do que as fêmeas, isto porque apresentam menor quantidade de camada de gordura fina das costas (P₂).¹³

2.2.3. Reações *postmortem* e a qualidade da carne

Após o abate do animal, dá-se a conversão do músculo em carne, fenómeno este que, resulta de um conjunto de reações que levam à alteração do músculo e só cessam, ou se reduzem, quando o *rigor mortis* se instala. Inicialmente, e devido à paragem da corrente sanguínea, ocorre um declínio abrupto do oxigénio que se encontra no músculo, o que resulta numa diminuição do potencial redox para valores inferiores a -50 mV, no término da atividade mitocondrial e na interrupção da respiração celular.¹² Os acontecimentos que sucedem o sangramento, realizam-se em anaerobiose, sendo o glicogénio o principal fornecedor de substrato às reações que são características ao *postmortem*. O metabolismo anaeróbico do glicogénio resulta, sobretudo, na formação de lactato, o que explica que a taxa de metabolismo anaeróbico que acontece no *postmortem* tenha um impacto crítico nos atributos da qualidade da carne.⁶ É por isso, fundamental, como veremos em seguida, que o controlo dos níveis de glicogénio e de creatina fosfato no momento de abate seja feito de forma adequada, permitindo a obtenção de carnes com maior qualidade, pois características como a capacidade de retenção de água melhoram, resultando em carne mais tenra e com maior valor nutricional, dado que a perda de nutrientes hidrossolúveis é menos significativa.¹⁷

Quer a diminuição do potencial redox, quer a paragem da respiração celular, resultam num aumento da concentração e deposição de ácido láctico, uma vez que a glicólise se dá em maior escala, levando a uma conseqüente diminuição do pH, para valores próximos de 5,6, resultando na desnaturação de proteínas, como a mioglobina, o que leva à perda de cor vermelha. A desnaturação das proteínas também influencia a perda de capacidade de retenção de água, levando a que a carne perca qualidade, quer nutricional, quer organoléptica.¹⁸ Cerca de 12 horas depois da morte do animal, com o aumento gradual de lactato e desenvolvimento de um ambiente ácido, a perda de água e amoníaco, NH₃, aumenta progressivamente. Esta perda de água provoca rapidamente

alterações na humidade que a peça de carne possa apresentar.¹⁹ Com a paragem da atividade celular e com a diminuição do pH para valores ácidos, a formação de ATP, a partir da glicólise é reduzida, no entanto, o seu consumo continua. Para que processos como a contração-relaxação ocorram, o músculo recorre às reservas de creatina fosfato, que permitem a ressíntese de ATP através de ADP, nucleótidos estes que, demoram cerca de 24 horas a desaparecer. Já a inosina e a hipoxantina (produto final), que são indicadores da perda total de qualidade, formam-se 7 dias após o abate e são os produtos finais da reação de quebra destes nucleótidos.¹⁸ Após a formação do complexo actomiosina, que se forma durante o processo de contração e que torna o músculo rígido, e com a insuficiência de ATP, o músculo não consegue relaxar, ficando permanentemente inflexível, levando assim, ao desenvolvimento do estado *rigor mortis*, resultando numa carne dura. O tempo *postmortem* necessário para que o *rigor mortis* se instale é variável e dependente de diversos fatores, como por exemplo: tamanho do animal e posteriormente da carcaça, quantidade de gordura e condições ambientais em torno da carne, nomeadamente, a temperatura de refrigeração.¹² O processo de refrigeração, em que se dá o arrefecimento da carcaça, afeta o rendimento da glicólise, que conseqüentemente, influencia a diminuição do pH e o tempo que demora até se atingir a condição de rigidez. Porém, este decréscimo da temperatura e a velocidade a que ocorre são, assim como o tempo até ao *rigor mortis*, influenciados pelo tamanho da carcaça e a espécie do animal. No entanto, também a localização anatómica do músculo é determinante para o arrefecimento, uma vez que músculos subcutâneos, arrefecem mais rapidamente²⁰.

A proteólise exerce um forte impacto na textura e na tenrura da carne, visto que contribui para a quebra das proteínas miofibrilares, que são responsáveis pela estrutura muscular. Este processo, que ocorre após a instalação do *rigor mortis*, influencia diretamente o sabor e aroma, dado que leva à produção de aminoácidos livres e peptídeos que influenciam as características organolépticas da carne ou dos produtos que dela possam derivar.¹⁰

Durante a maturação da carne, a proteólise dá-se em proteínas miofibrilares de importante relevo para a estrutura, como a troponina T, que sofre ação das calpaínas, resultando na libertação de fragmentos, com cerca de 30 kDa, como a nebulina, desmina, titina, entre outros, que se encontram associados com a tenrura da carne. Assim, a fragmentação proteica determina a tenrura que a carne poderá apresentar, sendo, portanto, possível avaliar a tenrura através do índice de fragmentação miofibrilar, IMF.²¹ O

processo de maturação é mais rápido na carne de aves seguindo-se a carne de porco, dado que as miofibrilas musculares das aves são facilmente degradáveis, facto que resulta de diferenças entre espécies, quer na atividade enzimática, conteúdo inibitório, quer na suscetibilidade à proteólise por parte da estrutura miofibrilar de cada animal. A taxa de rendimento da proteólise é afetada pela solubilidade das proteínas que, conseqüentemente, são afetadas por parâmetros como o decréscimo do pH, a concentração de ácido láctico e a adição de sal que pode ser feita durante a maturação.¹⁸ Todavia, com o aumento da idade do animal o processo de maturação é menor já que, com o avançar da idade a concentração de colagénio é maior e, portanto, o músculo é mais estável e mecanicamente mais resistente.¹¹

2.2.4. Influência da raça na qualidade da carne

Raças ou variações genéticas com reduzidas concentrações de lípidos totais no músculo, isto é, fosfolípidos e triacilglicerídeos, nos quais os fosfolípidos se encontrem em maior proporção, apresentarão maiores quantidades de PUFAs.²² Entre raças o conteúdo de fosfolípidos, no músculo *longissimus*, usualmente é semelhante, porém, existem diferenças na quantidade de triacilglicerídeos presentes nos lípidos totais.²³ No presente trabalho, as raças de porcos estudadas foram não só, as provenientes do cruzamento de um progenitor de raça pura, Pietran, e de progenitoras que resultam do cruzamento: Landrace × Large White (Figura 2) como, a linha pura de porco bísaro (Figura 3).

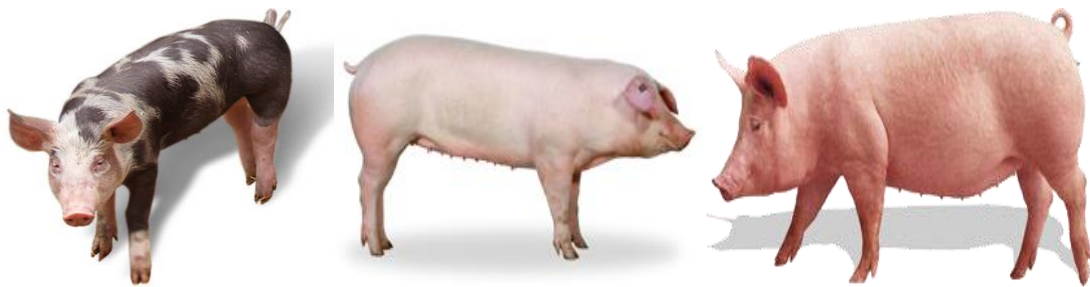


Figura 2 - Na imagem encontra-se um exemplar de cada uma das raças usadas para cruzamento, Pietran, Landrace e Large White, respetivamente.¹⁷

A raça Pietran caracteriza-se por um crescimento lento e uma proporção de fibras musculares brancas superior às vermelhas, sendo por isso, uma carne menos suscetível aos efeitos prejudiciais da oxidação. A carne desta raça surge com baixos teores de gordura, os animais são mais musculados do que o comum, o que resulta numa qualidade muscular elevada. Relativamente à camada de gordura fina das costas, comumente

designada pela posição P_2 , estes animais, normalmente, apresentam uma média de 9,00 mm, valor que está abaixo em relação às restantes raças.²⁴ O valor da posição P_2 , é calculado a partir de uma distância média de 6-8 cm da linha média dorsal na última curva da costela, locais estes que, segundo inúmeras pesquisas, são os mais apropriados para a avaliação da profundidade da camada dérmica dos animais vivos.²⁵ A raça Landrace, em semelhança à raça anterior, surge com uma carne magra, de baixo teor de gordura, todavia, superior à da raça Pietran. São animais cujo P_2 varia, normalmente, para valores aproximados de 13 mm, surgem com boa capacidade proliferadora e com elevada habilidade e desempenho materno, fatores que tornam este animal bastante frequente em programas de produção de híbridos.²⁴ Já os porcos Large White, que resultam do cruzamento de raças geneticamente distantes, são animais precoces, de crescimento rápido, estrutura fina e também com baixos teores de gordura, apresentando um P_2 médio de 12 mm; as fêmeas desta raça caracterizam-se pela alta produtividade e por serem boas leiteiras.¹³ Finalmente, O porco bísaro é um animal de grande porte (figura 3), podendo o seu comprimento variar entre meio metro e um metro e meio, podem surgir com pelo preto, branco ou malhado e apresentam elevada prolificidade. Apresentam um P_2 de 17 mm e a sua carcaça contém uma percentagem de músculo superior à de gordura, fator que lhe confere distinção a nível da qualidade organolética, já que a quantidade de gordura intramuscular é elevada.²⁶



Figura 3 - Exemplar da raça de porco bísaro numa produção em ambiente aberto.

Como existe um bom balanço entre os ácidos gordos saturados e insaturados, com predominância do ácido oleico, a qualidade organolética e tecnológica da carne é elevada, fator que contribui para a produção de processados de grande qualidade, da qual é

exemplo o lombo curado, como será apresentado em seguida. Em consonância com as características relativas a cada raça abordadas até ao momento, torna-se importante destacar que, nos últimos anos, têm ocorrido mudanças significativas no tipo de porco que é produzido, principalmente no Reino Unido e mais alguns países do norte da Europa. Existe a preferência por modelos de crescimento rápido e com baixas percentagens de gordura, em combinação com o uso de machos puros, o que resulta em carcaças com baixo teor de gordura e conseqüentemente uma maior propensão para a obtenção de carne com elevada qualidade, principalmente nutricional.²⁷

2.2.4.1. Lombo Curado – processo de cura: alteração de vários aspetos bioquímicos

O lombo de porco bísaro, proveniente do músculo *longissimus*, sofre um processo de cura seco com duração de 5 meses, sob controlo da humidade e da temperatura, estes que são fatores de risco para o crescimento microbiano e a conseqüente degradação do produto. Este processo inicia-se com a cobertura da superfície da peça com sal, de forma homogénea, para que ocorra uma penetração uniforme por toda a peça, seguida pelo armazenamento do lombo em ambiente regulado permitindo a saturação da carne ao longo do tempo.²⁸ Aquando do término do processo é obtido um produto firme e com uma camada de gordura superior de destaque, conferindo-lhe um sabor e tenrura característicos agradáveis ao consumidor.²⁶

Como o pH durante o processo de cura é neutro, ou varia ligeiramente em torno de pH 7, estimula a atividade proteolítica, principalmente das calpaínas, das catepsinas B e L e ainda de várias aminopeptidases, o que permite inferir que neste processo existe sobretudo uma ativação de proteínas miofibrilares. No final do processo verifica-se um desvanecimento da linha Z e um enfraquecimento das fibras, dada a ação enzimática, já que as catepsinas D permanecem estáveis até 6 meses de processamento e as catepsinas B, L e H permanecem ativas durante todo o processo de cura, originando vários fragmentos peptídicos, 2700-4500 Da, vários aminoácidos livres como a valina, alanina e lisina e ainda ácidos gordos livres, todos estes responsáveis pelo desenvolvimento de cor, sabor, textura e cheiros bastante apelativos.²⁹ Com o desenrolar do processamento a atividade das lipases, estimulada pelo sal, forma elevadas quantidades de ácidos gordos livres, oriundos dos fosfolípidos da membrana, sobretudo nas camadas mais à superfície, onde a quantidade de sal é maior, o que resulta conseqüentemente, numa diminuição da

quantidade de água, dada a perda de fluido intramuscular. Assim, a carne é seca e a probabilidade de contaminação microbiológica é bastante reduzida, o que irá permitir o aumento da validade do produto.³⁰ A atividade das lipases é amplificada a pH neutro e a a_w baixa, levando ao aumento da deposição de ácido oleico, palmítico, esteárico e araquidónico, responsáveis pelo sabor característico do produto. Todavia, com o aumento de ácidos gordos livres, aumenta o grau de insaturações disponíveis, o que resulta numa maior propensão oxidativa.³¹ As condições em que a cura é realizada promovem o ambiente oxidativo o que irá resultar no desenvolvimento de cor, sabor e aromas característicos, como será abordado em seguida.

O processo de cura pode ser feito com recurso a sal, nitratos ou nitritos, responsáveis pela alteração da cor (já que complexam com a mioglobina levando ao desenvolvimento de cores escuras), açúcar e condimentos, componentes que mediante as quantidades utilizadas irão originar diferentes características no produto final.³² Como o processo de salmoura é lento, o controlo da temperatura, com variação entre 2°C a 4°C, é fundamental para a preservação do lombo, já que temperaturas inferiores a 4°C retardam o crescimento de microrganismos. Como o sal reduz a atividade da água verifica-se um menor crescimento bacteriano, sobressaindo apenas o crescimento de bactérias halófilas, estas que são tolerantes a elevadas quantidades de sal.²⁸ Assim, para o lombo curado esperam-se elevadas quantidades de ácido oleico, taxas oxidativas ligeiramente elevadas, atividade da água e humidade reduzidas. Com base no processamento sofrido espera-se que o lombo curado surja com elevada qualidade tecnológica e organolética.

2.3. Processos oxidativos e a sua contribuição para a perda de qualidade

A conceção de que a deterioração microbiana é o principal fator de perda no sector de produção e comercialização de carne suína e derivados é errónea, isto porque, a degradação oxidativa dos constituintes da carne assume papel igualmente importante. Esta é responsável por elevadas perdas já que induz diversos processos que resultam num decréscimo de qualidade promovendo, conseqüentemente, uma rápida diminuição do tempo de prateleira e por isso, prejuízos elevados.³³ Torna-se assim importante perceber de que modo é que a oxidação afeta negativamente a qualidade da carne, em todas as suas vertentes, e de que forma a solução proposta neste trabalho, futuramente apresentada, pretende antagonizar a sua ação. Assim, de modo a facilitar a compreensão dos assuntos

abordados são lembrados em seguida, alguns conceitos básicos relativos ao conceito de oxidação.

2.3.1. Reações Oxidativas – Mecanismo de ação

As reações oxidativas, de origem química ou bioquímica, resultam da perda de elétrons ou átomos de hidrogénio por parte de uma determinada molécula. A existência de um agente redutor, capaz de doar elétrons, implica a existência agente oxidante, que apresenta capacidade para aceitar o elétron doado, portanto, percebe-se que deverá existir um equilíbrio controlado entre estes. A ocorrência deste tipo de reações implica a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigénio que são deveras prejudiciais ao organismo.³⁴ De modo a contrariar esta tendência existem compostos antioxidantes, que são moléculas capazes de antagonizar as reações oxidativas passíveis de acontecer no organismo, promovendo a estabilidade oxidativa, este que é um acontecimento capaz de minimizar possíveis lesões em determinados constituintes da carne.³⁵ Em sistemas biológicos, o termo pró-oxidante refere-se a espécies capazes de promover a oxidação, como as espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de nitrogénio (RNS), intermediários das oxidações lipídicas e proteicas e ainda, metais de transição, como o ião ferroso (Fe^{2+}). Assim, com o intuito de proteger o organismo do animal é imperativo a presença de moléculas com atividade antioxidante vigorosa, como a superóxido dismutase ou o α -tocoferol, de modo a que ocorra uma inibição da atividade de pró-oxidantes.³⁶ Na figura 4, é representada, de forma generalizada, a ação protetora de antioxidantes sobre células musculares.

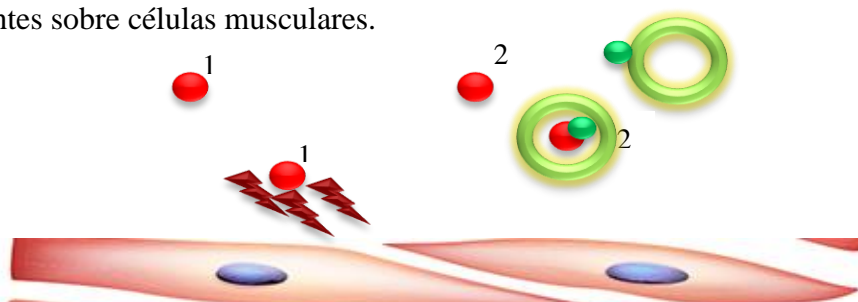


Figura 4 - Representação generalizada da ação anti- e pró-oxidante sobre células do músculo liso. 1 - Ação de um pró-oxidante sobre a membrana celular, da qual resulta a danificação da membrana, a qual pode ou não ser reversível. 2 - Ação antioxidante de um determinado composto sob um pró-oxidante com a sua consequente inibição. Esta ocorre através da cedência de um átomo de hidrogénio, com a sua consequente oxidação, que é aceite pela molécula oxidante, levando a que esta se reduza, estabilizando-a. Deste modo, uma molécula antioxidante para além do seu papel no processo oxidativo protege também as células, e portanto, o organismo do animal.

2.3.2. Ambiente oxidativo na carne de porco

Quando as células do músculo de animais sofrem lesão, devido, por exemplo, ao processo de abate, o ambiente oxidativo é favorecido, afetando pigmentos, lípidos, proteínas, hidratos de carbono e outros constituintes celulares e, conseqüentemente, uma perda de qualidade geral.³⁷ Monahan *et al.* (1994),³⁸ em concordância com ensaios já realizados, verificaram através de um estudo em costeletas de porco, que as alterações bioquímicas que acompanham o metabolismo do animal no desenrolar do processo *postmortem*, onde se dá a conversão do músculo em carne, originam condições nas quais os processos oxidativos deixam de ser fortemente controlados e deste modo, o balanço entre fatores pró-oxidativos e a capacidade antioxidante favorece a oxidação.³⁸ Após o abate, é improvável que sistemas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, ceruplasmina e transferina, se encontrem disponíveis nas células da mesma forma que acontecia no animal vivo, já que cessa a entrada de alimentos e diminui a quantidade de sistemas ou metabolitos antioxidantes que não são produzidos pelas células do organismo e têm origem na dieta, como por exemplo o retinol, as vitaminas E e C, carotenoides, cobre, manganês e selênio.³⁹ A extensão e a taxa de oxidação são influenciadas por eventos que antecedem e precedem a morte do animal, nomeadamente, o stress em que este se encontra, o pH do músculo e a temperatura da carcaça.⁴⁰ Após o abate, a carcaça é submetida a ações que alteram a integridade do músculo como o desmanche, a cozedura e/ou processamento, alterações estas que também se verificam na compartimentação celular.⁴¹

Todavia, a oxidação em sistemas biológicos, neste caso na carne suína, não acontece num único ato isolado, como apresentado de forma simplista anteriormente. Esta resulta numa combinação de reações que se poderão influenciar mutuamente, tornando as reações oxidativas verdadeiros ciclos viciosos, que na ausência de um controlo adequado levam a uma rápida degradação e conseqüente perda de qualidade da peça de carne, ou de algum dos seus possíveis derivados.⁴² Posto isto, em seguida, é abordada de que forma a oxidação e a sua desregulação promovem a perda de qualidade, através da sua interação com vários parâmetros associados a esta.

2.3.3. Impacto da oxidação a nível lipídico

Os ácidos gordos polinsaturados encontram-se em baixas quantidades na carne, pelo que as tentativas para aumentar a sua concentração apresentam um risco associado:

o de originarem maiores quantidades de produtos de oxidação lipídica, em consequência da lipólise que poderá acontecer.⁴³ Halliwell et al. (1993)⁴⁴, através de métodos experimentais como a determinação de espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico realizados em fluídos e tecidos humanos, definiram a peroxidação lipídica como um conjunto de reações/etapas resultante da interação de lípidos com pró-oxidantes, como espécies reativas de oxigênio ou radicais livres. Este acontecimento resulta na formação de hidroperóxidos, como 13-hidroperoxi-*cis-9,trans-11*-octadecadienóico, que deriva do ácido linoleico, ou 16-hidroperoxi-*cis-9,cis-12,trans-14*-octadecatrienóico, com origem no ácido linolénico, que se intitulam como os produtos primários desta cadeia de reações.⁴⁴ Como o porco é um animal cujo metabolismo e anatomia se assemelham bastante com a fisionomia humana é possível extrapolar e supor que no organismo do animal a peroxidação lídica aconteça sob condições semelhantes.⁴³

A lipólise é um conjunto de reações que contribui para a qualidade da carne, dado que resulta na formação de radicais livres e produtos primários, alguns dos quais têm uma influência direta no sabor, enquanto outros podem ser oxidados a compostos que, também eles, são precursores de sabor, podendo neste caso, conferir um sabor agradável ou desagradável.⁴⁵ Como mencionado anteriormente, a carne de porco é rica em fibras vermelhas e, portanto, possui ferro e fosfolípidos em elevadas quantidades, o que a torna suscetível a estas reações.¹² A obtenção de carne picada ou moída promove maiores taxas oxidativas, uma vez que, com o aumento da área de superfície e com o processo de trituração, a incorporação de oxigênio é maior. Os triacilglicerídeos são os componentes maioritários, cerca de 90%, do tecido adiposo. A sua quebra, por ação de várias lipases, da qual resulta a formação de glicerol e AGs livres, afeta a textura do tecido adiposo, e, quando demasiado extensa, poderá contribuir para o desenvolvimento de aromas rançosos, devido à formação de hexanal, e de alterações na cor, surgindo uma gordura com coloração amarelo-pálido, já que os radicais que se formam, fruto da oxidação lipídica, podem promover a oxidação do grupo ferroso (Fe^{2+}) da oximioglobina.²⁴ No músculo, a classe de lípidos mais significativa são os fosfolípidos, que, normalmente, surgem com ácidos gordos mono- e polinsaturados, estes últimos mais predominantes, característica que lhes confere mobilidade, algo que é importante para a sua função enquanto constituintes da membrana celular, sendo a estrutura membranar altamente suscetível ao grau oxidativo a que o músculo possa estar sujeito.⁵ O efeito dos AGs no tempo de prateleira é explicado pela propensão destes a sofrer oxidação, dado que o grau

de insaturação influencia esta predisposição, pois o carácter nucleofílico das duplas ligações promove a sua reação com espécies reativas de oxigénio, que normalmente possuem carácter eletrofílico, acontecimento este que pode culminar no desenvolvimento de aromas rançosos à medida que o tempo de disposição para venda avança.⁴⁶ Não obstante, é importante realçar que este processo é acelerado pelo aumento da temperatura tornando-se assim responsável pelo surgimento de sabor após cozedura da carne e pela deterioração da carne cozinhada, dada a elevada taxa de peroxidação lipídica. A carne cozinhada é, deste modo, mais suscetível à oxidação do que a carne fresca ou congelada antes de qualquer processamento.¹²

Fautsman et. al. (2010)⁴⁷ apresentam, com base na literatura antecedente, três passos essenciais e consecutivos na peroxidação lipídica (Figura 5), esta que é uma reação auto catalítica, já que, após a sua iniciação, tem capacidade para se auto propagar e auto acelerar, todavia, esta cadeia reacional não é termodinamicamente espontânea, necessitando por isso, a presença de um catalisador.⁴⁷ O primeiro passo, a iniciação, consiste na formação de um radical livre, que resulta da reação de um pró-oxidante como o radical hidroxilo, $\text{OH}\bullet$, este que remove um átomo de hidrogénio da molécula, neste caso os lípidos, originando um radical lipídico.⁴⁸ Esta etapa pode ser catalisada enzimaticamente pela lipoxigenase muscular ou quimicamente pela temperatura, catiões metálicos ou humidade. Assim, a presença de metais de transição, como o ferro, que podem atuar como catalisadores, promove a captação de um protão de hidrogénio da dupla ligação presente nos AGs insaturados, originando assim, os produtos radicalares, estes que são prejudiciais para a manutenção da homeostasia do animal.⁴⁴ Em seguida, na etapa de propagação, a partir do radical previamente formado em reação com oxigénio dá-se a formação de radicais peróxidos que reagem com insaturações, por exemplo, presentes em ácidos gordos, originando os produtos de oxidação primários, os hidroperóxidos, que são altamente instáveis. Para além da fase de iniciação, os metais de transição também atuam na fase de propagação, catalisando a quebra de hidroperóxidos.⁴⁹ A última fase desta cadeia reacional é a terminação, esta que se pode tornar algo equívoca atendendo ao facto de que, a peroxidação lipídica é um acontecimento cíclico, contudo, esta fase pode ocorrer sobre três hipóteses, estas que podem decorrer simultaneamente. A primeira acontece devido às elevadas quantidades do radical peroxil, levando a que as reações entre estes compostos ocorram formando produtos não radicalares, que se revelam estáveis. A segunda hipótese é colocada para

possibilidade de qualquer um dos radicais, peroxil, alcoxil ou alquil, sofrer um processo de condensação que resultam na formação de dímeros e de oxigénio, esta conjectura é passível de se verificar com maior incidência para menores temperaturas. Por último, em condições de baixa pressão de oxigénio e elevadas temperaturas, os radicais podem combinar-se originando também dímeros que, mediante as circunstâncias são bastante estáveis.⁴⁴ Usualmente, apenas estas três hipóteses são consideradas, porém, a fase de terminação pode também ocorrer na presença de um composto antioxidante, já que a sua atividade lhe permite converter estas espécies propícias à continuidade do processo reacional em produtos não radicalares de baixa reatividade.⁴ Contudo, esta fase final promove a formação de compostos voláteis, como hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, aldeídos, como o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), cetonas, que poderão atuar como precursores de sabor, que transmitem sabores desagradáveis na carne e derivados, principalmente durante a fase de cozedura e armazenamento.⁵⁰

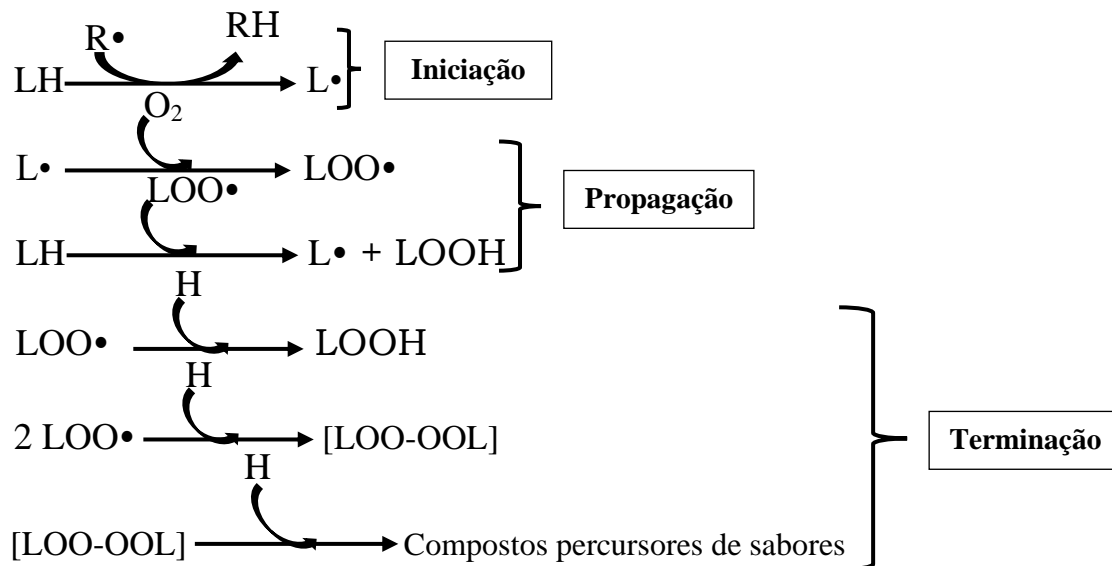


Figura 5 - Etapas da peroxidação lipídica. *Iniciação*, consiste na formação de um radical livre, que resulta da reação de prooxidante R•, este que remove o radical o átomo de hidrogénio da molécula, neste caso os lípidos. Esta etapa pode ser catalisada enzimaticamente pela lipoxigenase muscular ou quimicamente pela temperatura, catiões metálicos ou humidade. Em seguida, a partir do radical previamente formado em reação com oxigénio dá-se a formação de radicais peróxidos, a **propagação**, que reagem com insaturações, por exemplo, presentes em ácidos gordos, originando os produtos primários, os hidroperóxidos, que são altamente instáveis. A última fase desta cadeia reacional é a **terminação**, que pode ocorrer sobre três hipóteses, que podem decorrer em paralelo. A primeira resulta da reação entre os radicais peroxil formando produtos não radicalares, que se revelam estáveis. A segunda hipótese é colocada para possibilidade de qualquer um dos radicais, peroxil, alcoxil ou alquil, sofrer um processo de condensação que resultam na formação de dímeros e de oxigénio. Por último, os radicais podem combinar-se entre si originando também dímeros que, mediante as circunstâncias são bastante estáveis.¹⁴⁴

É importante ressaltar que, com o aumento do nível de insaturações os ácidos gordos tornam-se mais suscetíveis ao processo oxidativo, facto que nos leva a compreender que os AGs ómega-3 e -6 são bastante afetados. Do ponto de vista nutricional, a perda de ω -3 é desaconselhável já que estes contribuem de forma positiva para a saúde humana, atuando como precursores de diversos metabolitos necessários ao organismo.⁴³ Assim, do processo de oxidação lipídica resulta a produção de aromas desagradáveis que afetam o odor e o sabor, e radicais livres que podem também contribuir negativamente para outros parâmetros, como por exemplo, oxidação da oximioglobina e a estabilidade e integridade da membrana, como analisaremos em seguida. Contudo, é importante realçar, que para condições devidamente controladas, o processo de oxidação lipídica pode ser favorável ao desenvolvimento de características agradáveis e apreciadas pelo consumidor, por exemplo em produtos transformados, o aroma e sabores ligeiramente rançosos podem ser associados a qualidade e considerados satisfatórios ao paladar do provador, como é o caso do presunto ou carne fumada. Neste tipo de produtos a cor escura é também apreciada, assim, deve haver um balanço estritamente regulado que permita o desenvolvimento destes atributos sem que ocorram processos deteriorativos que impliquem perdas para as indústrias, sobretudo de transformados, que detêm especial interesse na ocorrência deste tipo de reações, na procura por sabores e aromas distintivos, porém, dentro de ambientes equilibrados.²⁸

2.3.4. Cor: um parâmetro crucial na qualidade da carne

A decisão de compra do consumidor, mais do qualquer outro parâmetro como o aroma, textura ou sabor, fundamenta-se na cor que a carne apresenta, sendo a coloração vermelha associada a frescura e, portanto, a procurada. Assim, esta torna-se a principal condicionante de consumo, podendo resultar em elevadas perdas económicas, uma vez que, na presença de um produto que não satisfaça as condições mencionadas anteriormente, o individuo não efetua a compra.⁵¹ A taxa de descoloração tem sido relacionada com alterações nos constituintes da carne provocadas por processos oxidativos e com a capacidade de sistemas antioxidantes contrariarem a ocorrência dessas alterações.⁷ A espécie do animal, o género, a idade aquando do abate e a localização anatómica do músculo, são parâmetros que afetam a qualidade da carne no que se refere à cor e às alterações que sofre, por exemplo, tipicamente, os machos têm maiores concentrações de mioglobina, pigmento responsável pela cor da carne, do que as fêmeas.⁵²

2.3.4.1. Mioglobina

A mioglobina, que é o principal pigmento responsável pela cor da carne, é uma proteína solúvel constituída por 8 hélices alfa que se ligam através de pequenas secções não-helicoidais. Entre os vários aminoácidos que constituem esta proteína, a histidina é um dos que mais se destaca já que possui um importante papel quer estrutural quer funcional.⁵³ A mioglobina possui um anel heme, cujo centro se liga a um átomo de ferro, o qual poderá formar 6 ligações: quatro dessas ligações estabelecem-se com nitrogénios pirrólicos, a quinta coordena-se com a histidina, localizada na posição 93 da cadeia e a sexta encontra-se disponível para ligações que poderão ou não ser reversíveis. Nesta posição, o ligando que estabelece ligação ditará a cor do músculo em conjunto com a valência da molécula de ferro.⁵¹

Quando a sexta ligação do ferro está livre, a mioglobina é usualmente mencionada como desoximioglobina, DMB, e surge com uma cor arroxeada; quando é estabelecida uma ligação com oxigénio, é designada como oximioglobina, OMB, apresentando uma cor cereja, vermelho vivo.⁵⁴ Quando o estado de oxidação do ferro, passa da sua forma ferrosa (Fe^{2+}) para a sua forma férrica (Fe^{3+}), a sexta posição é ocupada por uma molécula de água, formando-se a metamioglobina (MMB), cuja cor é castanha. A sexta posição pode ainda estabelecer ligações com nitritos, e outros componentes, que são responsáveis pelas cores características de carnes curadas.⁷

Sen et al. (2011)⁵⁵ depreenderam que a resposta dos pigmentos ao calor determina largamente a cor da carne cozinhada. A desnaturação da mioglobina e de outras proteínas responsáveis pela cor dá-se entre 50°C-80°C.⁵⁵ As isoformas da mioglobina diferem na sua sensibilidade à temperatura, sendo a desoximioglobina a menos sensível à desnaturação por calor, seguida da oximioglobina, e por fim pela metamioglobina, apresentando estas duas últimas sensibilidades muito semelhantes.⁵⁴ Quando sujeita ao aumento da temperatura a metamioglobina forma um complexo castanho, o ferrihemocromo, enquanto que as restantes, quando desnaturadas, originam um complexo vermelho, o ferrohemocromo. A cor final depende da extensão da formação de ferrihemocromo, cuja quantidade é proporcional à concentração de mioglobina inicial, antes desta sofrer qualquer processo de conversão.⁷

Para além do calor, a conversão do ião ferro na sua forma ferrosa (Fe^{2+}) para a forma férrica (Fe^{3+}) acontece através da ação de pró-oxidantes. Na presença de uma molécula de oxigénio o átomo de ferro pode reagir levando à formação do anião

superóxido, $O_2^{\cdot-}$, e à conversão simultânea do ião para a sua forma férrica. Deste anião superóxido que se forma pode surgir peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , através da reação de dismutação, este que, por sua vez, poderá também reagir com Fe^{2+} promovendo a sua oxidação e a produção do radical hidroxilo, OH^{\bullet} . O processo de oxidação da mioglobina é, como podemos assim verificar, descrito, mecanisticamente, através das reações de Fenton (Figura 6)⁵⁶.

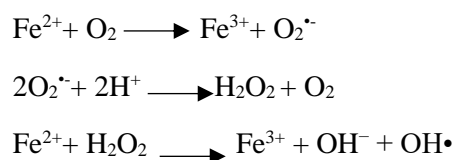


Figura 4 - Reação de Fenton. Reação de espécies reativas de oxigénio com o ião ferro, na sua forma ferrosa Fe^{2+} , da oximioglobina, com a sua consequente conversão em metamioglobina, devido à presença Fe^{3+} .⁵⁴

O estado de oxidação da mioglobina e dos lípidos encontram-se fortemente relacionados, uma vez que, o aumento de um, provoca o aumento do outro, e, por exemplo, em carnes cruas, a oxidação de lípidos polinsaturados tem um impacto de maior destaque sobre a mioglobina.⁵¹ As reações oxidativas envolvidas na cozedura da carne, por si só, promovem o aumento dos níveis de MMB e de ferrihemocromo, efeito que se pode intensificar quando o conteúdo de gordura é elevado.⁵⁴ Pensa-se que esta relação entre a oxidação lipídica e a formação de MMB esteja relacionada com a formação de radicais livres ou com a depleção de oxigénio durante a oxidação lipídica. É de realçar, no entanto, que embora o conteúdo lipídico possa influenciar a cor da carne cozinhada, este não tem um impacto tão significativo como outros fatores, nomeadamente, o pH ou o processo de congelação.⁵⁷

2.3.4.2. Influência da dieta na cor

Uma dieta rica em antioxidantes resulta numa redução das perdas de água e numa manutenção estável da cor, estes ajudam também a manter os gradientes intracelulares de cálcio e promovem a elevada energia dos fosfatos envolvidos na glicólise. O desaparecimento da glucose livre está relacionada com o escurecimento do músculo, um aumento do potencial glicolítico promove a acidez, a palidez do músculo e a cor amarela que a gordura apresentará, porém, o potencial glicolítico afeta sobretudo o pH, e não a cor do músculo.⁷ É devido a este fato, que, de forma estratégica, se alimenta os animais com hidratos de carbono digestíveis no final do seu tempo de engorda, antes do abate,

deste modo os níveis de glicogénio armazenado no músculo aumentam, o que resulta num escurecimento do músculo sem afetar o pH.⁵⁷

2.3.4.3. Variações no pH e a qualidade da carne – influência na cor

Durante o sangramento do animal não ocorrem alterações significativas no pH do músculo do animal, porém após cerca de 40 minutos este diminui ligeiramente e 24 horas depois verifica-se um decréscimo significativo do seu valor. Com a cessão da glicólise *postmortem*, último fator influenciador das variações de pH, este surge com valores médios de $5,75 \pm 0,55$.⁵³ Todavia, um decréscimo brusco do pH, para valores médios de $4,94 \pm 0,16$, em conjunto com uma temperatura elevada do músculo e uma taxa glicolítica elevada, com a extensão e rapidez da quebra de ATP, pode resultar no desenvolvimento de um tipo de carne mole, pálida e exsudativa (PSE).⁵⁸

Lesiów *et al.* (2012)⁵⁹ descrevem carnes do tipo PSE como uma condição típica de carnes com valores de pH baixos, encontrada sobretudo em porcos, mas também em aves e ruminantes.⁵⁹ Este tipo de carnes forma-se quando o animal é submetido a um stress elevado imediatamente antes do abate.¹⁴ O glicogénio, durante o *postmortem*, é rapidamente consumido, e, portanto, o processo de acidificação é acelerado levando a que o pH decresça significativamente e de forma bastante rápida, enquanto o músculo ainda está quente.⁶⁰ A combinação da temperatura elevada com um pH reduzido provoca a desnaturação de proteínas, perda de água e a abertura da estrutura muscular. O pH reduzido tem tendência para promover a oxidação da oximioglobina e desoximioglobina a metamioglobina castanha, que quando combinada com a elevada dispersão da luz na superfície da carne, culmina na sua palidez. A glicólise *postmortem* provoca a diminuição do pH, tornando a superfície da carne mais brilhante e húmida.³ As condições PSE e DFD (carne dura, escura e seca) influenciam a cor da carne cozinhada. Através de um estudo feito em músculos *Longissimus* de porcos, Christensen *et al.* (2010)⁶¹ verificaram que a desnaturação da mioglobina é mais rápida nas carnes PSE de porco quando em comparação com a carne normal, principalmente a temperaturas abaixo de 71°C.⁶¹ Com um pH reduzido a formação de metamioglobina é favorecida e ocorre uma destabilização da DMB, estabelecendo-se, portanto, uma relação muito forte entre o pH da carne crua e a cor que esta apresenta quando cozinhada.⁵¹

Quando as reservas de glicogénio são baixas, mesmo antes do abate, o pH final da carne é superior ao valor médio normal, anteriormente mencionado, e, portanto, acima do

ponto isoelétrico, as proteínas tendem a associar-se com água no músculo, o que, conseqüentemente, resulta em fibras musculares fortemente empacotadas.¹⁴ Surge então, a condição de carnes DFD, onde a escuridão da carne deriva do facto da superfície não dispersar a luz na mesma extensão da carne mais aberta e com um pH final mais baixo. Conclui-se, portanto, que o pH tem impacto na carne e na sua qualidade relativamente à cor, retenção de água e rendimento de cozedura.⁵³ A carne com o pH acima de 6,2, carne DFD, tende a apresentar fibras com elevada capacidade de retenção de água, o que dificulta a penetração de oxigénio dada a sua estrutura fechada, fazendo com que qualquer molécula de O₂ que alcance o espaço intracelular seja utilizada pelo citocromo C, este que apresenta elevada atividade resultante do pH elevado. A mioglobina roxa-avermelhada, que sucede o fenómeno anteriormente descrito, combina-se com a estrutura cerrada do músculo para absorver em vez de refletir luz, fazendo com a carne aparente ser mais escura.⁶² É importante referir também que, como ocorre a promoção de uma maior estabilidade das enzimas antioxidantes, existe a proteção da oximioglobina na sua forma reduzida.⁶³ Conseqüentemente, a carne DFD surge com uma taxa de desnaturação da mioglobina lenta e a carne permanece cor de rosa, mesmo quando confeccionada mediante as recomendações, o que resulta num problema adicional para a qualidade da carne, isto porque, os consumidores ficam com a perceção de que a carne está menos cozinhada e continuam o processo a temperatura elevada durante algum tempo, com subseqüentes perdas na qualidade (ex: textura, suculência).⁹

2.3.5. Atividade da água e a qualidade da carne

As membranas celulares atuam como barreiras protetoras, função biológica que lhes é característica, contra mudanças possivelmente deteorativas em alimentos quer de origem vegetal, quer de origem animal.¹⁴ A diminuição de fluidez, a disrupção da estrutura com conseqüente perda de integridade da membrana, devido à oxidação dos fosfolípidos aí presentes, afeta a sua capacidade para agir como barreira semipermeável o que poderá levar a perdas de qualidade organolética e nutricional, em conseqüência do comportamento exsudativo que se estabelece.⁵³ Segundo Sapirstein et al. (2000)⁶⁴, as fosfolipases A₂, que são as enzimas responsáveis pela quebra dos fosfolípidos da membrana e conseqüente formação de ácidos gordos livres, podem ser ativadas em maior escala na presença de um ambiente oxidativo, o que resulta num ataque ainda mais proeminente à estrutura celular.⁶⁴ A perda de estrutura dos fosfolípidos leva à perda da integridade da membrana celular e à perda de conteúdo intracelular, levando a reduções

na qualidade nutricional, com perdas de metabolitos hidrossolúveis, e organoléptica, com a ocorrência da peroxidação lípica.⁶⁵ Contudo, é importante ter presente que as perdas exsudativas não acontecem apenas através da deterioração da membrana, mas também através das perdas de água de carne PSE, cujo pH reduzido afeta a carga elétrica das proteínas levando a que o ponto isoelétrico seja atingido e a que a água não consiga estabelecer ligação, através de pontes de hidrogénio, levando ao conseqüente gotejamento.⁵³ Aspectos como a humidade e a atividade da água tornam as carnes mais suscetíveis à contaminação microbiológica, já que promovem um ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento de microrganismos, desse modo, a sua redução é fundamental para a qualidade e segurança alimentar.⁶⁵

2.3.6. Qualidade da carne: o sabor

Os sabores que a carne, processada ou não, exhibe advêm de reações entre hidratos de carbono e proteínas, da degradação dos produtos destas reações, e também de produtos da degradação lipídica (ex: aldeídos, álcoois e cetonas), estes que também poderão participar nas reações de Maillard.⁵⁰ Compostos como a inosina, fosfato, ribose, compostos fenólicos, heterocíclicos e detentores de grupos sulfureto são notáveis precursores do sabor.

Se nos momentos que antecedem o abate o animal for submetido a condições de stress, que conduzem a um consumo exarcebado de glicogénio e outros hidratos de carbono presentes, promovendo a carência dos mesmos, é presumível um aumento anormal da incidência de sabores desagradáveis, não só em animais como os porcos, mas também em vacas e cordeiros.⁶⁶ A produção de compostos com grupos sulfureto, durante o processo de cozedura, é impulsionado pelo aumento de pH, com variações de valores de 5,6 para 6,1, acontecimento que tem como origem as más condições de abate do animal, como foi anteriormente referido, resultando na produção de carne escura.¹⁰ Não obstante, também o elevado teor de água, a maturação da carne, que resulta da quebra gradual das estruturas das proteínas miofibrilares que termina na tenderização da peça ou carcaça, são processos que à semelhança dos anteriores, promovem alterações no sabor através da formação de peptídeos e aminoácidos.⁶³

Os compostos carbonílicos, como os aldeídos hexanal e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), têm um forte impacto no desenvolvimento de sabor de carnes não curadas, com especial destaque para o hexanal, que é utilizado como marcador primário da deterioração

do sabor da carne. Este é um componente presente na carne fresca, refrigerada ou congelada, sendo portador de um odor característico forte e penetrante. Quando a carne não curada é armazenada após cozedura o sabor altera-se rapidamente, desenvolvendo-se um sabor oxidado proveniente da produção de compostos como os já mencionados, fenómeno este que, é fortemente impulsionado com a exposição ao calor.⁶⁷

2.3.7. Qualidade da carne: tenrura

A variação da tenrura dá-se principalmente a partir de alterações na estrutura das proteínas miofibrilares do músculo, no período entre o abate do animal e o consumo da carne. Se a carcaça é refrigerada muito rapidamente após o abate, as fibras musculares vão contrair severamente e o resultado será um ‘encurtamento frio’ no qual a força requerida para separar e fatiar as fibras após cozedura aumenta drasticamente.⁶ Alterações nas proteínas miofibrilares do músculo são também causadas por enzimas proteolíticas, por exemplo, o sistema enzimático de calpaínas (EC 3.4.22.17), m-, μ -, durante a maturação e armazenamento, as quais promovem a fragmentação da estrutura muscular, o que enfraquece e facilita que a carne se desfaça na boca.²²

À medida que a gordura no animal aumenta, isto é, o conteúdo lípido muscular, esta aumenta em vários locais do corpo, o que poderá surtir um efeito positivo para a tenrura da carne.⁴ Inicialmente, esta acumula-se em zonas subcutâneas e em espaços intermusculares, o que poderá promover a insulação dos músculos contra os efeitos da refrigeração. Em estágios mais tardios do crescimento do animal, a gordura acumula-se no músculo, nomeadamente no tecido conjuntivo perimisial.⁴⁶ À medida que a gordura intramuscular aumenta é possível que o músculo apresente uma menor resistência ao corte devido à diluição das proteínas fibrosas na gordura.²⁰

O grau de saturação dos AGs presentes é importante para a textura, uma vez que, quanto maior for, mais rígida será a peça, dado que a mobilidade celular será reduzida. Os ácidos esteárico e linoleico, caraterísticos da carne de porco, são contribuidores importantes para a firmeza do tecido adiposo, e, conseqüentemente, é-nos possível fazer uma boa previsão desta condição na carne através da razão $\frac{18:0}{18:2}$.⁶⁸ Carnes ricas em AG polinsaturados como o ácido linoleico podem a apresentar-se moles e de textura desagradável para o consumidor, e também com caraterísticas de textura inapropriadas para processamento.¹³ Não obstante, tendo em conta o papel dos ácidos gordos na tenrura da carne, é de extrema importância a manutenção estável da sua estrutura. Assim, um

ambiente oxidativo exacerbado é bastante prejudicial para a manutenção desta característica organoléptica. Mais uma vez, verificámos a importância da manutenção de um ambiente de equilíbrio redox para a manutenção da qualidade em parâmetros ideais.²²

O tecido adiposo consiste não só na gordura contida nos adipócitos, mas também na matriz de tecido conjuntivo em associação com a água. Nos porcos, a concentração de água na camada de gordura fina das costas é bastante elevada, assim como a concentração de colagénio, sendo possível a previsão da firmeza que a carne poderá apresentar com base no teor destes dois constituintes.¹⁴ O problema da separação do tecido adiposo, isto é, a falta de consistência, é desagradável na carne de porco fresca, mas especialmente desagradável no bacon e fiambre, retirando ao produto a consistência desejada. Andersen et al. (2005)³ demonstraram que a coesividade da carne está fortemente relacionada com a quantidade de água, com o colagénio e concentrações dos ácidos esteárico e linoleico, e que através da inclusão de extratos de plantas na dieta é possível alterar o teor de AGs e deste modo provocar alterações quer a nível do ponto de fusão dos AGs quer na firmeza da carne.¹⁹

A correlação feita entre a idade do animal e a tenrura que a carcaça poderá apresentar acontece devido às alterações que ocorrem no tecido conjuntivo à medida que o animal envelhece. O tecido conjuntivo é composto por colagénio, tipo I, III, IV e V, e por proteínas estromais como a elastina e reticulina. O colagénio tipo I é o componente maioritário do epimísio e do perimísio, estes que envolvem o músculo. Já o colagénio tipo III, IV e V é encontrado no endomísio e providencia suporte às fibras musculares. Na ausência de ligações cruzadas o colagénio, independentemente do tipo, apresenta uma estrutura flexível, contudo, à medida que a idade do animal avança o número de ligações cruzadas aumenta.⁶⁹ O aumento das ligações cruzadas no colagénio, torna-o numa malha inflexível que se reflete na carne através da dureza que esta apresenta. Assim, o animal deve ser abatido antes que este processo ocorra, o que levou a que no presente trabalho os animais fossem abatidos entre os 3-4 meses, tendo em conta sempre o percentual de gordura pretendido.

2.4. Manipulação da dieta: uma solução promissora?

Os suínos são animais com um aparelho digestivo tubular simples, semelhante ao do ser humano, com apenas um estômago e intestino delgado, local onde ocorre a absorção da maioria dos nutrientes. Este órgão é revestido por uma mucosa enrugada,

onde ocorre a segregação de inúmeras enzimas digestivas que promovem a quebra de várias moléculas facilitando a sua absorção. Como as vilosidades intestinais são altamente irrigadas é previsível que a absorção seja ótima e ocorra de forma praticamente direta para a corrente sanguínea. Deste modo, espera-se que uma manipulação adequada da dieta resulte no melhoramento de características da carne, quer organolépticas, quer nutricionais, facto que foi verificado por Wenk et al (2003)⁷⁰.

Animais monogástricos, como os porcos, são animais cuja dieta a que são submetidos se reflete diretamente no seu organismo e metabolismo, por exemplo, uma dieta rica em cereais poderá resultar numa maior quantidade de PUFAs, do tipo ω -3, nos lípidos totais, algo que é benéfico para a saúde. Por isso, estes tipos de animais são facilmente manipuláveis relativamente à sua composição de AGs no tecido adiposo e no músculo. A composição fosfolipídica é a menos influenciada pela dieta, dado que os fosfolípidos (FL) são constituintes da membrana celular, o que os torna menos acessíveis para possíveis alterações na sua conformação.³ Contudo, alterações drásticas no perfil de AG das membranas celulares poderão provocar alterações nas propriedades das membranas e conseqüentemente alterações em várias funções fisiológicas. Posto isto, é fundamental o controlo restrito da quantidade e tipos de PUFAs que constituem a membrana celular, existindo assim, complexos enzimáticos compostos por elongases e dessaturases, responsáveis pela formação de AGs de cadeias mais longa, que são depois incorporados nos FL, ocorrendo, porém, competição entre ω -3 e ω -6 neste processo.⁷¹

As possíveis diferenças na razão ω -6/ ω -3 estão dependentes da suplementação na dieta destes tipos de ácidos gordos, embora esta razão seja também influenciada pela espécie. A carne de animais monogástricos geralmente tem uma razão ω -6/ ω -3 superior à dos ruminantes, mesmo quando estes são alimentados com elevadas quantidades destes PUFAs, como o ácido linolénico (C18:3) ou o ácido docosahexaenóico (C22:6), isto porque, devido à biohidrogenação, saturação dos AGs, que ocorre no rúmen, acontecem várias alterações na composição do perfil lipídico do animal.⁷² A nível da constituição intramuscular, para além dos efeitos genéticos, a composição lipídica também varia através de fatores nutricionais, geralmente relacionados com um tipo alimentação em particular. O enriquecimento em AGs ómega 3 da carne, principalmente na dieta do porco, é feito com o principal objetivo de fornecer ao consumidor uma fonte de ω -3 acessível e que não implique muitas alterações na sua gastronomia tradicional.³⁷

2.4.1. Efeitos de fontes da dieta de ω -3 nas razões ω -6/ ω -3 e AGs polinsaturados/AGs saturados (P/S)

As fontes de ω -3 da dieta, como por exemplo, óleos vegetais, de sementes e/ou de peixe, não afetam diretamente a razão entre ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos saturados (P/S). Esta razão é sim maioritariamente influenciada pela genética e em particular pela gordura total do animal. Todavia, a razão ω -6/ ω -3 é fortemente influenciada pela composição de AGs da dieta, já que a inclusão de fontes de ω -3 na dieta do animal aumenta o seu conteúdo total, o que acontece em paralelo com a diminuição da deposição de AG ω -6 intramuscular, uma vez que a suplementação com ω -6 é baixa e, portanto, a razão ω -6/ ω -3 também será.⁴ À medida que a idade do animal vai avançando, dos 3 aos 30 meses, quer o ácido palmítico, quer o esteárico diminuem em proporção e o ácido linoleico aumenta, este último deriva exclusivamente da dieta, o que resulta num aumento de ácidos gordos ómega 6 que deve ser contrariado. Em animais novos e magros (magros porque ainda não tiveram tempo suficiente para acumular gordura) ou animais alimentados com uma dieta baixa em energia, as concentrações de ácido oleico e de ácido linoleico presentes nos FL, diminuem e aumentam, respetivamente, exercendo um forte impacto na composição dos AGs do músculo.¹⁶ À medida que a gordura aumenta o papel dos FL é cada vez menos importante sendo o papel dos TAG mais realçado, já que, no porco o uptake de ómeegas é relativamente rápido e a sua incorporação mais favorável nos triacilglicerídeos do que nos fosfolípidos.⁴¹ O uso de óleos vegetais ou de grãos integrais resulta num aumento limitado do ácido docosahexaenóico (DHA), um ómega-3 com 22 carbonos, no tecido muscular, dado que a formação de DHA é estritamente regulada de forma metabólica e não pode ser substancialmente influenciada pela dieta, quer nos animais monogástricos quer nos ruminantes.⁷¹

O consumo de AGs de cadeia longa, ω 3, por parte da população humana, como EPA e DHA é normalmente feito através da ingestão de AGs dos peixes (como o salmão, atum, etc). Nas sociedades do Ocidente, como por exemplo, na Europa, o consumo de gordura proveniente do peixe é baixo e tradicionalmente os hábitos alimentares são difíceis de mudar na população. O consumo de AGs ω -3 a partir de animais terrestres, ou produtos derivados, é limitado à ingestão de ácido linolénico e uma quantidade muito pequena de EPA e DHA. Daí que estratégias de alimentação destes animais têm, cada vez mais, sido adotadas de modo a alterar a sua composição de AG, e dos seus derivados,

para valores nutricionais próximos dos recomendados.¹⁶ Um elevado nível de gordura intramuscular, comumente designada por gordura mármore no músculo, tem sido associado ao melhoramento da qualidade da carne, tornando-se o desafio, aumentar a gordura intramuscular no músculo para um nível que irá proporcionar maior satisfação no momento de ingestão da peça de carne.⁷¹

Todavia, no presente trabalho, onde o principal objetivo se define pela avaliação da qualidade da carne de porco, fresca e transformada, após introdução de um aditivo alimentar na dieta, não é abrangida a suplementação da dieta do animal com ácidos gordos polinsaturados. Porém, dada a atividade antioxidante prevista para o produto, é esperada uma manutenção, resultado da proteção das insaturações, dos ácidos gordos. Deste modo, é expectável que a quantidade de ácidos gordos de cadeia longa seja maior na presença do *Mega Sense* pois, como o ambiente oxidativo está controlado, a quebra destes ácidos gordos não será tão vigorosa, e o valor nutricional da carne e a sua qualidade prevêm-se melhoradas.

2.4.2. *Mega Sense*: uma proposta para o aumento da qualidade da carne e processados

De modo a contornar a perda de qualidade da carne, em consequência de processos oxidativos e com o intuito de minimizar as perdas na indústria de produção e retalho de carne, foi desenvolvido um produto cuja constituição visa a inibição ou redução da atividade oxidante promovendo, deste modo, um aumento da qualidade. O *Mega Sense* é um produto essencialmente natural, constituído por três componentes maioritários, vitamina E, taninos e extratos de plantas, combinação que resulta numa capacidade antioxidante elevada, que se espera ativa na carne de porco após ingestão do produto, como aditivo na ração.^{72, 73} Com a redução da tendência oxidativa esperam-se diversas alterações positivas na qualidade da carne, como é possível verificar na Figura 7. A formulação do *Mega Sense* visa, com uma redução do ambiente oxidativo, promover uma melhoria da qualidade da carne e derivados, já que surtirá um efeito indireto em vários fatores que a influenciam. Assim, na presença do *Mega Sense* espera-se um abrandamento da oxidação da mioglobina, o que irá resultar na cor vermelha desejada pelo consumidor. Quanto à peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante do produto permite a manutenção das insaturações de ácidos gordos de cadeia longa, o que é benéfico para a saúde e contribui também, para uma redução do desenvolvimento de odores e aromas rançosos.⁷⁴ Como existe uma atenuação no grau oxidativo, o ambiente ácido não é

promovido e, deste modo, ocorre uma manutenção benéfica do pH, acontecimento que em conjunto com a peroxidação lipídica, resulta na conservação da

integridade da membrana celular e, portanto, a retenção de água e metabolitos é maior, havendo uma mitigação na exsudação que a carne poderá apresentar.²

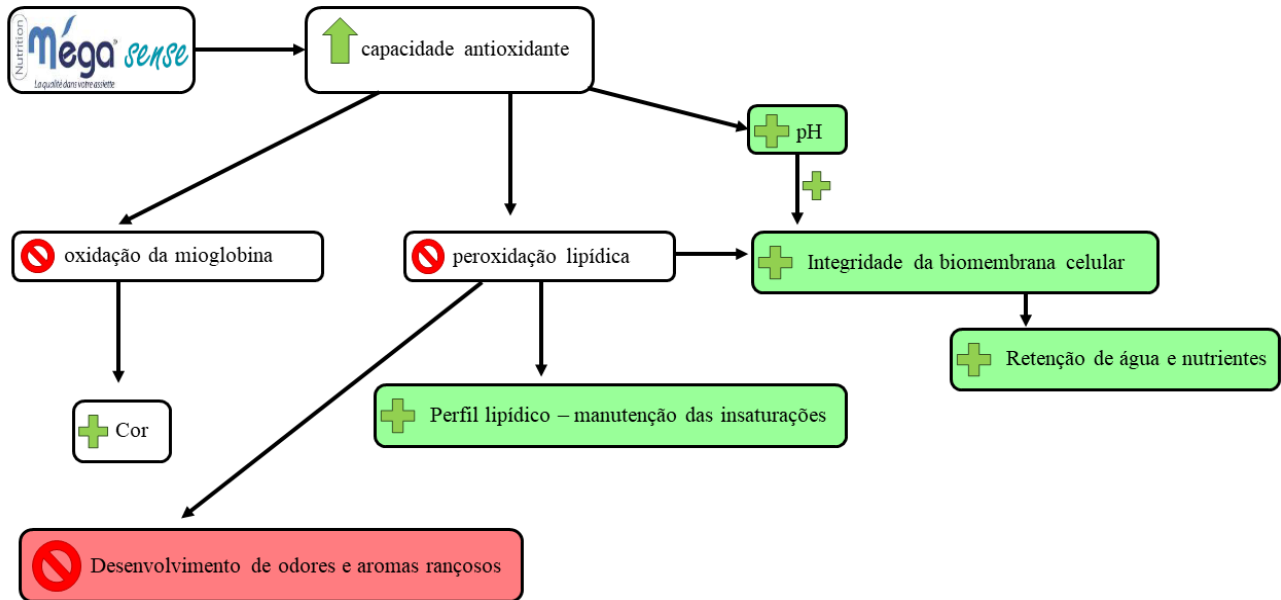






Figura 7 - Esquema representativo da ação do *Mega Sense* em vários parâmetros associados à qualidade da carne.

A manipulação da dieta do animal para conseqüente alteração das características da carcaça é uma ideia há muito aplicada, tabela 2, pelo que torna o *Mega Sense* um produto, numa primeira análise, redundante e básico. No entanto, a utilização deste produto como aditivo nas rações é uma estratégia inovadora, já que a maior parte das tentativas até agora utilizadas passaram pelo enriquecimento das dietas, com a introdução de mais vegetais e sementes com o intuito de reduzir a atividade antioxidante. O desenvolvimento de um produto com uma atividade antioxidante forte, capaz de resistir ao processo digestivo (mecânico e químico) e de absorção facilitada, destaca o *Mega Sense* pela sua enorme potencialidade no combate oxidativo. É também importante destacar que, é a primeira vez o *Mega Sense* está a ser testado em ambiente de produção, onde a sua eficácia é condicionada, pela capacidade de ingestão do animal e a frequência com que a faz e pela dieta que o produtor aplica em simultâneo com o produto

Tabela 2 – Suporte bibliográfico que sustenta a potencialidade de extratos naturais de plantas enquanto antioxidantes.				
Extratos	Quantidade	Tempo de administração	Efeitos	Artigos
<i>Lippia spp.</i>	5 mg/kg	Desde o desmame até ao abate	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ oxidação lipídica; ▪ odor e aromas rançosos. 	Rossi R. et al (2013) ⁷⁵
α -tocoferol	10 mg/kg; 100 mg/kg; 200 mg/kg.	≈ 14 semanas	 <p>Para níveis elevados de vitamina E:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ proteção a nível da membrana; ▪ carne não é suscetível à oxidação. 	Asghar A. et al (1991) ³⁸
<i>Humulus Lupulus L.</i>	0 mg/kg; 120 mg/kg; 140 mg/kg; 360 mg/kg;	≈ 35 dias	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ redução da oxidação lipídica sem afetar atributos físicos da carne. 	Sbardella M. et al (2017) ⁷⁶
<i>Origanum vulgare L.</i>	Mix de extratos	Cerca de 155 dias	 <ul style="list-style-type: none"> ▪ oxidação lipídica; 	Ranucci D. et al (2014) ⁷⁷
<i>Lippia spp.</i>	0 e 5 mg/kg	A partir do último período de engorda do animal.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diminuição da suscetibilidade oxidativa; ▪ Não se verificaram alterações na qualidade dos produtos processados; 	Pastorelli G. et al (2015) ⁷⁸
<i>Salvia officinalis;</i> <i>Urtica dioica;</i> <i>Melissa officinallis;</i> <i>Echinacea purpúrea.</i>	500 mg da mistura	Período da engorda dos 60±0,5kg até aos 120±2,0kg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento da estabilidade oxidativa; ▪ Diminuição do colesterol; ▪ Aumento do conteúdo de PUFAS. 	Hanczakowska E. et al (2015) ⁷⁹
Polpa de alfarroba	- 8% da totalidade do mix administrado; - 15 % da totalidade do mix administrado.	120 dias antes do abate	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento do conteúdo de MUFAS e PUFAS; ▪ Oxidação deteriorativa lenta durante 9 dias de armazenamento. 	Insera L. et al (2015) ⁸⁰
<i>Laminaria digitata</i>	500 mg/kg	21 dias antes do abate	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento dos antioxidantes plasmáticos; ▪ Diminuição da oxidação lipídica. 	Moroney N. C. et al (2012) ⁷⁵
<i>Origanum vulgare L</i> e cinemaldeído	80 mg/kg	Variação de peso: 30 kg até 100 kg	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diminuição da perda de água; ▪ Diminuição da condutividade; ▪ Diminuição da perda de peso após cozedura; ▪ Aumento da capacidade de retenção de água 	Skalska K.A. et al (2011) ⁸¹

2.5 Validação e acreditação do método de ensaio aplicado para a determinação de ácidos gordos em matrizes alimentares variadas

Para a DIN SA, a acreditação do método que permite a determinação do perfil lipídico em matrizes alimentares, através da norma NP EN ISO/IEC 17025:2017⁸², é um processo fundamental para o destaque da empresa no mundo empresarial. Com a credibilidade associada à execução da metodologia aumentada é também importante a definição de condições de medição favoráveis para que o método seja executado de forma aproximada com o ideal. Este projeto surge assim em complementação do trabalho previamente realizado, já que irá permitir a determinação de ácidos gordos de cadeia maior. A validação e acreditação de uma metodologia são processos que implicam um elevado grau de conhecimento acerca do fundamento, do procedimento, aparelhos usados e análise dos resultados. Para que estes sejam possíveis devem ser efetuados vários testes estatísticos cujo principal objetivo é verificar a eficácia e o nível de desempenho quer do método, quer do analista. De modo a facilitar a compreensão do projeto em redor da validação do método mencionado, surge em seguida uma revisão bibliográfica onde se pretende ilustrar o conhecimento necessário para este caso em particular.

2.5.1. Cromatografia gasosa acoplada ao detetor por ionização de chama

A cromatografia gasosa, GC, tem como princípio a separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Inicialmente a amostra é vaporizada, através de uma chama, e transportada num fluxo promovido pelo gás de arraste, que pode ser hidrogénio, hélio ou nitrogénio designado por fase móvel.⁸³ Esta corrente de fluxo permite que a amostra atravesse uma coluna, cujo interior é revestido por determinado material de polaridade variável dependendo dos compostos a separar e das condições de cromatografia a aplicar, designado por fase estacionária, sendo que, para os ácidos gordos que são os analitos que se pretendem separar e estudar no presente trabalho, quanto menos polar for, melhor será o grau de separação. Para além da composição da coluna, o grau de insaturação e o tamanho da cadeia carbonada dos ácidos gordos são cruciais para efeitos de separação, como veremos em seguida, já que, ácidos gordos menos saturados e com cadeia carbonada mais curta eluem primeiro, surgindo com baixos tempos de retenção no cromatograma.⁸⁴ Os componentes da mistura em análise, com diferentes tempos de retenção, atravessam a coluna transportadas pelo gás de arraste e alcançam o detetor, que consiste num dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de substância eluída que chega até si. O registo deste sinal em função do tempo de eluição

acontece em cromatogramas, onde as substâncias devidamente separadas surgem com picos cuja a área é proporcional à sua massa, possibilitando desta forma, uma análise quantitativa dos constituintes da mistura inicial.⁸⁵

2.5.1.1. Constituição do aparelho de GC-FID

O equipamento usado na análise cromatográfica gasosa, comumente designado por cromatógrafo, é constituído por três componentes essenciais: o injetor, a coluna de eluição e o detetor, estes que, serão abordados com algum detalhe em seguida. O bom funcionamento e a obtenção de dados credíveis por parte deste aparelho exigem uma coordenação entre todos os componentes, assim como a otimização do seu desempenho. De modo a perceber a estrutura de um cromatógrafo será feita uma descrição detalhada da sua composição geral, tendo como base o aparelho manipulado nos laboratórios da DIN, SA.

2.5.1.1.1. Injetor split/splitless

A injeção em modo *split/splitless*, largamente estudada por Grob et al (1969 a e b)^{86,87}, sendo por isso trivialmente designada por injeção de Grob, divide-se em dois momentos. Inicialmente, aquando da injeção, a câmara de entrada do injetor encontra-se com a válvula de *split* fechada, isto é, em modo *splitless*, garantindo que toda a amostra alcança a coluna. Após um período de tempo pré-estabelecido, o tempo de purga, dá-se a abertura da válvula, alterando-se o modo para *split*, o que promove a partição dos vários componentes da amostra antes da sua entrada para a coluna e a limpeza da entrada do injetor de possíveis resíduos.⁸⁸ Todavia, é importante ter presente que deve existir um compromisso no estabelecimento do tempo de purga, já que, este não deve ser demasiado curto pois poderia eliminar amostra, nem demasiado longo pois torna-se provável a passagem de solvente para a coluna. Assim, este deve ser suficiente de modo a permitir o fluxo dos componentes para o interior da coluna, com a menor quantidade de volume possível, sendo a possibilidade deste ajuste a principal vantagem deste modo de injeção.⁸⁷ Em suma, a injeção *split* leva à diminuição da amostra que entra na coluna, dado o fluxo da coluna e o fluxo *split*, a injeção *splitless* promove a entrada de toda a amostra assim como do solvente, e a combinação de ambos, prevê a entrada de toda a amostra com um volume irrisório de solvente.⁸⁷

2.5.1.1.2. Coluna – Fase estacionária

A escolha da coluna em análise por cromatografia gasosa é um passo crucial para a máxima eficiência na execução, determinação e quantificação de um ou vários componentes da amostra em estudo.⁸⁹ As colunas podem ser capilares ou compactadas, sendo estas últimas recomendadas apenas para análises preliminares, já que não possuem uma resolução elevada, isto é, são de baixa sensibilidade. Quanto às capilares, estas são de resolução superior pelo que se adequam ao estudo de amostras mais complexas, como por exemplo, amostras cujo objetivo é a separação de ácidos gordos, tendo por base o tempo de retenção.⁹⁰ Portanto, existe um conjunto de características a definir com base no tipo de análise que se pretende fazer, nomeadamente, o comprimento da coluna e o seu revestimento interno. Colunas que possuam um comprimento elevado são, usualmente, recomendadas para a análise de misturas complexas, uma vez que a resolução se prevê maior e a sua eficácia na separação de ácidos gordos de cadeia carbonada longa também.⁹¹ Ainda assim, conjugada com o comprimento da coluna deve ter-se em atenção a polaridade do revestimento interno da coluna, já que mediante a composição do constituinte a analisar, cuja polaridade varia mediante a presença e ausência de grupos funcionais, esta também deverá variar. No presente estudo, pretende-se a análise de ácidos gordos pelo que, o uso de colunas de baixa polaridade será o mais indicado, apesar de associada à baixa polaridade da fase estacionária poder ocorrer a co-eluição de ácidos gordos, principalmente daqueles que possuem tamanho da cadeia carbonada semelhante e que variam no número de duplas ligações.⁹² À medida que o composto a analisar atravessa a coluna, este vai estabelecendo várias interações com a fase estacionária, nomeadamente, de Van Der Waals, dipolo-dipolo e pontes de hidrogénio. A maior ou menor retenção, traduzida pelo tempo de retenção, dependerá da afinidade do composto para a fase estacionária, ou seja, do número e intensidade de interações que entre eles se possam estabelecer. Porém, é relevante notar que a espessura do filme da fase estacionária é também importante para o tempo de retenção de cada analito, já que quanto maior for, maior será o tempo de retenção, já que as interações são maiores.⁹³

2.5.1.1.3. Detetor por ionização da chama – FID

O FID tem a capacidade de detetar o analito num fluxo de gás, através da sua devida ionização na chama, usualmente de hidrogénio. Durante o processo de combustão dos compostos presentes na amostra de interesse, dá-se a formação de partículas eletricamente carregadas, iões e eletrões livres, capazes de gerar um sinal elétrico que se sobrepõe ao produzido pela própria chama ou pelo gás de arraste responsável pelo

transporte dos componentes em análise.⁹⁴ Este sinal elétrico é amplificado através de eletrodos presentes no detetor, entre a chama e o coletor, resultando, posteriormente, num cromatograma que ilustra a formação de íões por unidade de tempo. Assim, através do tempo de retenção, que se define como o tempo que um determinado analito levou a alcançar o detetor, é possível identificar o composto e através da área do pico avaliar quantitativamente a sua presença na amostra de análise. Porém, e modo a que a identificação seja completamente confiável devem utilizar-se padrões de identificação, sendo possível a sua aplicação através de duas formas distintas: o método do padrão interno, onde o padrão, que é um ácido gordo ausente da amostra, pode ser incluído na mistura de análise e, dessa forma, surge no cromatograma da matriz, permitindo a quantificação dos AGs a partir do AGs padrão; ou método do padrão externo, que implica a execução de curvas de calibração para cada um dos ácidos gordos que se pretende quantificar.⁸⁹

Em suma, é possível inferir que a formação de íões é proporcional à concentração do analito na amostra aquando da injeção, assim o FID torna-se sensível à massa do composto, surgindo com um limite de deteção superior a 5 carbonos. Este tipo de deteção é bastante recomendado e adequado para hidrocarbonetos, cujos fatores de resposta são dependentes do número de carbonos, sendo por isso, normalmente elevados. Já amostras que possuam heteroátomos têm tendência a apresentar fatores de resposta inferiores.⁹³

2.5.1.2. Teoria dos pratos teóricos

A teoria dos pratos teóricos, proposta por Martin e Synger (1941)⁹¹, demonstra que a eficácia da separação pode ser quantificada através de um prato teórico, mais concretamente a partir da sua altura e da sua frequência numa coluna de análise cromatográfica. Se visualizarmos um processo de destilação fracionada, a coluna de fracionamento no seu interior possui uma coluna em forma espiral, em que cada loop corresponde a um prato, quanto maior for esta coluna e, portanto, quanto maior for o número de pratos, maior eficácia se prevê obter no processo destilatório.⁹⁵ Por analogia, no caso específico da cromatografia divide-se a coluna em pratos teóricos, uma vez que estes não são fisicamente visíveis, e prevê-se que a eficácia varie proporcionalmente com o número de pratos de uma coluna e portanto, com o seu comprimento.

O comprimento da coluna permite a determinação da altura dos pratos, H , em cada uma destas partes resultantes da partição hipotética da fase estacionária. Espera-se que

seja atingido um equilíbrio entre o analito e as fases estacionária e móvel.⁹⁶ Assim, para a determinação quantitativa da eficácia da separação de um determinado método cromatográfico e considerando que todo o processo de eluição do analito acontece sobre uma distribuição gaussiana, é possível calcular o número de pratos de uma coluna (N) e consequentemente, classificar o desempenho da análise.

$$\text{Equação 1: } N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

onde, t_R corresponde ao tempo de retenção de um determinado analito e W_b corresponde a metade da área do pico obtido deste mesmo analito no cromatograma.⁹¹ Adicionalmente ao cálculo do número de pratos teóricos é possível, como visto anteriormente, delimitar a altura de cada um (H) através da seguinte equação:

$$\text{Equação 2: } H = \frac{L}{N}$$

onde L corresponde ao comprimento da coluna e N ao número de pratos teóricos, calculados na equação 1. Contudo, é importante ressaltar que este modelo teórico não identifica os diversos parâmetros que poderão interferir prejudicialmente no desempenho da coluna, definindo-se deste modo, como uma forma grosseira e simplista de avaliar a performance da fase estacionária no processo de eluição e consequente separação.⁹⁵

2.5.1.2.1. Equação de Van Deemter

Introduzida por Van Deemter em 1956, a equação 3 permite-nos avaliar a fase móvel, isto é, o papel do gás de arraste no processo de transporte da mistura desde o momento de injeção, passagem pela fase estacionária e por fim, chegada ao detetor. Esta fórmula correlaciona a altura de um prato teórico com a velocidade linear que o gás de arraste poderá assumir, permitindo, mais uma vez, a avaliação da eficácia do processo de separação.⁹⁷ Assim, segundo a equação de Van Deemter (Eq. 3):

$$\text{Equação 3: } H = A + \frac{B}{\mu} + C_s\mu + C_m\mu$$

Nesta equação, a variável A , designada normalmente por difusão de Eddy, corresponde aos vários percursos que os constituintes da amostra em análise podem realizar ao longo do seu percurso na fase estacionária. A variável $\frac{B}{\mu}$ corresponde à difusão

longitudinal, que ilustra a difusão do analito na fase móvel, que quanto maior for, maior será a largura do pico e, portanto, menor será a eficácia do processo.⁹⁸ Já os parâmetros $C_s\mu$ e $C_m\mu$ ilustram a transferência de massa passível de ocorrer durante a análise, na fase estacionária e na fase móvel, respetivamente. Estes exercem um grande impacto na forma dos picos, já que quanto mais longe se encontra o analito da fase estacionária, menor será o seu contacto com esta e, conseqüentemente, menor será o seu tempo de eluição e maior será o alargamento do pico, o que reflete uma eficácia reduzida.⁹⁵

Através da análise da Figura 8, é possível verificar que a equação de Van Deemter, conjuga 3 parâmetros que são cruciais para a máxima eficácia ser alcançada, permitindo-nos, com base no seu estudo, escolher o gás de arraste que melhor se adequa ao grau de exigência que se pretende para o método cromatográfico que se pretende implementar.

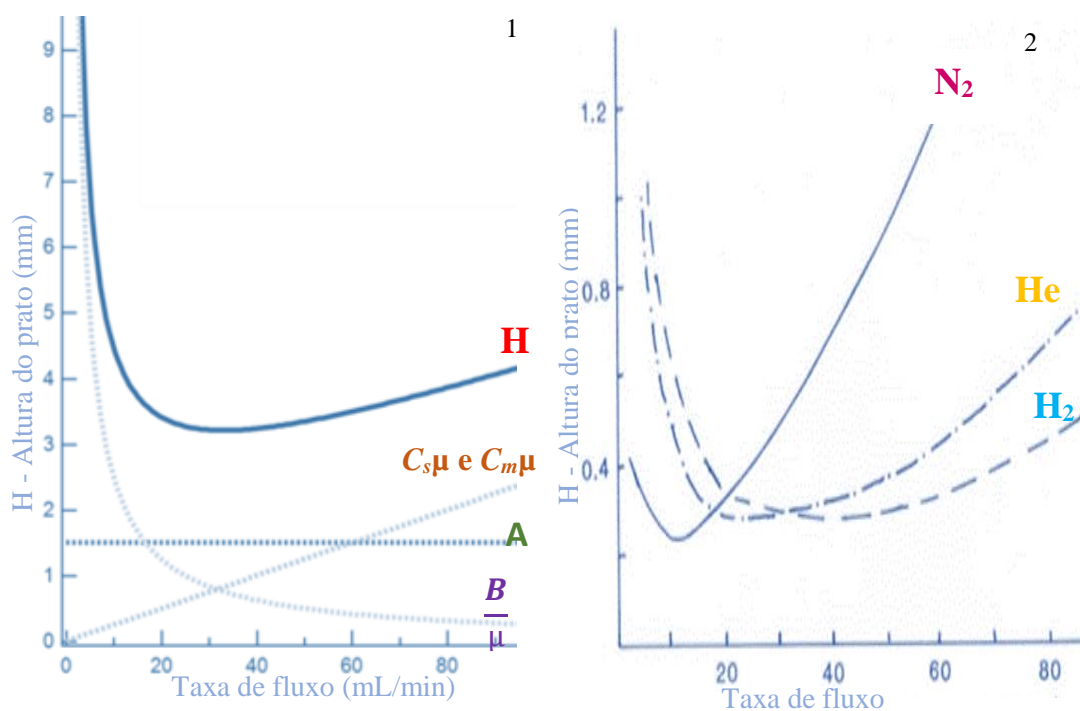


Figura 8- 1 - Representação gráfica da equação de Van Deemter. Esta permite-nos fazer uma previsão realista da eficácia do processo, ermitindo a escolha do gás de arraste mediante a exigência de separação pretendida. **2 – Representação gráfica das equações de Van Deemter para três tipos de gás de arraste, o N₂, o He e o H₂.** Através de uma análise cuidada é possível verificar que a curva que mais se assemelha ao ideal é a do Hélio, porém, é importante ter presente outros aspetos para além daqueles avaliados pela equação.

Para a escolha do gás de arraste que melhor se adequa às exigências de separação é importante ter presente as vantagens e desvantagens associadas à sua escolha, já que as necessidades dependem de vários parâmetros, como por exemplo, rapidez na obtenção de dados. Na tabela 2, são apresentadas algumas vantagens e desvantagens que devem ser analisadas no momento da escolha do gás de arraste.

Tabela 3 -Prós e contras na escolha do gás de arraste

Gás de arraste	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Nitrogénio	Acessível economicamente; De fácil obtenção.	Elevados tempos de corrida
Hélio	Bom compromisso entre a velocidade e o grau de separação.	Muito dispendioso
Hidrogénio	Acessível economicamente; Baixos tempos de corrida.	Explosivo, é necessário um controlo rigoroso

2.5.2. Análise de ácidos gordos

A análise do perfil lipídico de matrizes alimentares através de cromatografia gasosa é um processo bastante complexo já que, implica várias etapas de preparação da amostra que antecedem o momento de injeção. Assim, após esta abordagem que permitiu perceber a constituição e princípios de funcionamento do cromatógrafo torna-se necessário perceber se a metodologia aplicada para preparação da amostra para futura análise cromatográfica é a mais adequada, tendo em conta parâmetros como complexidade da matriz alimentar, custos associados ao uso de solventes e o grau de toxicidade que estes podem apresentar.

Usualmente, o conteúdo lipídico de uma qualquer matriz alimentar é determinado com recursos a métodos gravimétricos, que visa a extração destes compostos através de solventes. A possibilidade de opção no que respeita à metodologia a aplicar condiciona muitas vezes a decisão no momento de escolha, contudo, é importante ter em atenção sobretudo a tipologia da matriz alimentar que se pretende estudar, sendo, portanto, este o parâmetro de seleção principal. Os processos de extração que se destacam na literatura quer pela eficácia, quer pela fácil utilização são: extração via Soxhlet, Método Bligh; Dyer, Método de Gerber, Método de Foch e Roese-Goottlieb.⁸⁵ Estes métodos podem ser separados em duas categorias, as extrações realizadas a quente, que englobam o procedimento com recurso a Soxhlet e o método de Gerber, e as extrações realizadas a frio, que abrangem todos as restantes metodologias mencionadas. De modo, a simplificar a comparação destes procedimentos extrativos o método de Gerber e o de Roese-Goottlieb serão desprezados visto que, são métodos referenciados para produtos líquidos, nomeadamente leites, e produtos lácteos, segundo recomendações da AOAC e o presente

trabalho visa a validação da metodologia para aplicação em produtos sólidos, principalmente produtos cárneos, já que esta é a matriz alimentar de maior afluência no laboratório da empresa.⁹⁶

O método de Folch, desenvolvido por Jordin Folch e a sua equipa em 1956, é uma metodologia padrão enquadrada nas normas recomendadas pela AOAC, ou pela ISSO, que tem como princípio a extração do conteúdo lipídico através de uma mistura de clorofórmio e metanol, numa proporção 2:1, recorrendo a várias lavagens de modo a garantir a máxima eficácia. Contudo, este processo consome muito tempo e reagentes, dado que são utilizados elevados volumes, pelo que em ambiente empresarial se torna inviável a sua aplicação.⁹⁹ De modo, a contornar estas falácias Bligh e Dyer desenvolveram uma metodologia simplificada, que utiliza os mesmos solventes que Folch porém em menores quantidades e num menor espaço de tempo, viabilizando a sua utilização. Este procedimento é realizado a frio e prevê uma extração eficiente através de uma mistura de clorofórmio, metanol e água, já que tem como princípio, a formação de uma solução bifásica resultante da mistura de clorofórmio e metanol com água e a amostra em análise. Na fase que contém apenas clorofórmio encontra-se o conteúdo lípido presente na matriz em estudo, e na fase composta por água, metanol encontram-se todos os compostos não lipídicos. Em seguida, estas fases são separadas, o clorofórmio é evaporado e procede-se à esterificação, para posterior análise GC.¹⁰⁰ Relativamente, ao processo de extração via Soxhlet, este é feito a elevadas temperaturas e é um dos processos mais antigos, cuja a utilização é já secular. O princípio deste método visa o constante contacto da amostra com o solvente, no extrator de Soxhlet após condensação do solvente no condensador, que como se encontra a altas temperaturas consegue extrair da amostra o seu conteúdo lipídico, este processo de interação solvente-amostra é contínuo e ocorre durante aproximadamente 6 horas, facto que promove a eficiência da extração.⁹⁹ Tipicamente, e de modo a otimizar este procedimento é, previamente feito, uma hidrólise ácida da matriz em análise. Esta etapa acarreta consigo vantagens e desvantagens, na medida em que torna a extração lipídica mais fácil e eficaz pois, a hidrólise, realizada a quente, com recurso a um ácido forte como o ácido clorídrico, promove a quebra e rutura celular libertando todos os ácidos gordos que possam estar aprisionados no espaço intracelular, na membrana ou complexados com outros compostos, tornando os ácidos disponíveis para ação do solvente, usualmente o éter de petróleo.¹⁰¹ Todavia, as perdas que podem acontecer com a aplicação deste tratamento

prévio podem ser significativas, principalmente de ácidos gordos de cadeia curta que se encontrem livres. Quando comparados os métodos Bligh, Dyer e Soxhlet assemelham-se pela simplicidade de aplicação, contudo distinguem-se quer no tempo de execução, o primeiro é mais rápido, quer pelo tipo de solventes usados, o método de Soxhlet utiliza éter de petróleo que é mais barato e menos nocivo que o metanol e o clofórmio, e pelo tipo de matriz a que se adequa a sua aplicação. A extração Bligh, Dyer é recomendada pelos autores para amostras que contenham cerca de $80\% \pm 1\%$ de água e aproximadamente 1% de gordura, consideração que inviabiliza a sua aplicação para produtos cárneos cujo teor de matéria de gorda pode variar entre 5% até valores superiores a 30%, tendo em conta produtos transformados.¹⁰⁰ Assim, o método que melhor se adequa e permite a maior eficácia é o de Soxhlet, que apesar das contra-indicações mencionadas, é iniciado com uma hidrólise ácida, pois na carne os ácidos gordos esperados são o ácido palmítico, C16:0, esteárico, C18:0, e oleico, C18:1, sendo desprezável a presença de ácidos gordos de cadeia curta, pelo que a contribuição da hidrólise para uma extração eficaz é favorável.¹⁰²

Posto isto, é importante perceber a relação do solvente de extração com os ácidos gordos. O éter de petróleo apresenta carácter apolar apresentando afinidade para com a cadeia carbonada, esta que também é apolar, no entanto, é importante ter presente que um ácido gordo apresente uma região polar, grupo carboxílico, e uma região apolar, cadeia carbonada.¹⁰¹ Porém a região polar do ácido gordo normalmente encontra-se complexada na forma de fosfolípido ou triacilglicerídeos, pelo que a cadeia carbonada se encontra livre e disponível para interação com o solvente, mas mesmo na forma livre esta é eficaz. A qualidade de um solvente está relacionada com a sua eficácia de extração, relação qualidade-preço, baixa reatividade e nocividade, apenas este último não é verificável para o éter de petróleo, contudo, é na mesma o preferencialmente usado, mediante o rendimento de extração.¹⁰³

A preparação dos ácidos gordos para análise, isto é, a esterificação destes, pode ser feita com recurso a várias opções como o método KOH-HCl, que se baseia na conversão de lípidos em ésteres de metilo através da transesterificação através de metóxido de potássio em metanol absoluto, os ácidos gordos que se encontram livres são esterificados através de uma solução de ácido clorídrico em metanol. Ou como o método BF_3 que, promove a saponificação dos lípidos através de uma solução metanólica de hidróxido de sódio, cujos produtos obtidos são em seguida convertidos em ésteres de

metilo através da reação com uma mistura de metanol com trifluoreto de Boro (BF_3). A preparação dos ésteres de metilo é uma etapa fundamental na análise cromatográfica, uma vez que o processo de esterificação permite que no instante após injeção da solução para análise os ácidos gordos não vaporizem, entrem na coluna e eluam com o gás de arraste. Assim, para garantir a máxima eficácia no processo de esterificação, garantindo deste modo que, até os ácidos gordos livres são esterificados é utilizado o método BF_3 , que apesar de ser altamente tóxico e perigoso é mais eficaz. O BF_3 é um ácido de Lewis forte, que em conjunto com o metanol origina um complexo coordenado, que nas condições de refluxo em que o método é realizado, promove a rápida metilação dos ácidos gordos, quer na sua forma livre, que na sua forma esterificada, por exemplo, triacilglicerídeos. É recomendada, segundo as normas ISO 17764-1:2002, que a injeção da amostra deve ser feita com o solvente usado para extração. Apesar de a norma priorizar o uso de *n*-hexano, no laboratório da DIN é utilizado o 2,2,4-trimetilpentano, comumente designado por isooctano, devido aos baixos custos associados. A relação deste solvente com os ácidos gordos é semelhante à relação do éter de petróleo com estes, ou seja, ambos são apolares e apresentam afinidade, e elevada solubilidade.

Os parâmetros estruturais relacionados com os ácidos gordos e o processo de separação são vários, por exemplo, quando estes são de cadeia curta, apresentam maior volatilidade e, portanto, podem perder-se durante a sua preparação ou durante a análise. Assim, para uma taxa de eficiência maior é recomendada a utilização de colunas especializadas para este tipo de determinações.⁹⁸ Na separação de ácidos gordos devemos ter presente o grau de insaturação e o tamanho da cadeia, já que ambos influenciam o tempo de corrida. Contudo, deve existir um compromisso entre a polaridade da coluna, que se adequa à separação de ácidos gordos que diferem apenas pela quantidade de duplas ligações, e o comprimento desta, que nos permite uma melhor separação das cadeias carbonadas, porém, a co-eluição de isómeros poderá acontecer.¹⁰⁴ Por vezes a identificação total de um cromatograma é inviável apenas através de cromatografia, pelo que é aconselhado a complementação da análise através de espetrometria de massa. Esta última que separa os analitos mediante a sua carga, numa relação massa/carga, pois a análise é permitida através da formação de iões, esta técnica permite uma deteção qualitativa através da relação massa/carga (m/z) ou quantitativamente através da abundância.¹⁰¹

2.5.3. Validação da análise cromatográfica do perfil lipídico de várias matrizes alimentares

A validação de um processo de análise visa a uniformização e a padronização de todas as etapas que este envolve, promovendo a obtenção de resultados fiáveis, podendo desta forma, ser reproduzido sempre nestas mesmas condições, correspondendo ao nível de qualidade exigido pela empresa. A validação de um método de ensaio por parte de uma empresa tem como principal objetivo a sua posterior acreditação, meta a que a DIN S.A. se propõe, relativamente à acreditação da análise do perfil lipídico por método cromatográfico, segundo os termos da norma NP EN ISSO/IEC 17025:2017.⁸²

2.5.3.1. Descrição do método interno de trabalho

A estipulação e discriminação de todas as etapas de trabalho é crucial para a sua validação assim, num documento elaborado pelo laboratório, de carácter semelhante a uma norma, devem estar presentes os requisitos mínimos relativos à execução laboratorial da metodologia, permitindo que qualquer pessoa, com a devida instrução, seja capaz de reproduzir o ensaio. Mediante a tipologia de funcionamento e o grau de exigência associado a cada laboratório, o processo de validação deve estar sempre associado à execução de qualquer método interno, onde devem ser incluídos todos os resultados obtidos com a aplicação do mesmo.¹⁰⁵ O processo de validação divide-se em duas etapas fundamentais: (1) A avaliação direta, que engloba a determinação da gama de trabalho, da especificidade e seletividade do método, da curva de calibração, da linearidade, dos limites analíticos e da precisão, e (2) a avaliação indireta, que abrange os parâmetros que definem o grau de precisão de um método, isto é, os materiais de referência certificados, os ensaios interlaboratoriais e os testes comparativos.

2.5.3.2. Determinação da especificidade e seletividade

A especificidade de um método ilustra a capacidade deste para discriminar o analito de interesse entre uma mistura complexa, sem que na análise ocorram interferências por parte dos restantes componentes.¹⁰⁶ Esta capacidade de identificação isolada de um determinado composto de interesse torna a análise seletiva, o que nos permite assumir que a grandeza medida advém exclusivamente da medição do analito de interesse. Por exemplo, para o presente trabalho, com o desenvolvimento de um método

de elevada especificidade pretende-se garantir que para cada tempo de retenção em particular, o pico de eluição corresponde ao ácido gordo que lhe é característico.¹⁰⁷

Com intuito de perceber a capacidade de seleção de um método, isto é, perceber a sua sensibilidade a possíveis interferências, são realizados testes de recuperação, recorrendo a pelo menos 5 amostras todas com a mesma matriz, mas com concentrações diferentes do analito em estudo.¹⁰⁶ Todo o processo do ensaio de recuperação deve ser feito em duplicado, de forma a avaliar a repetibilidade da experiência. Com recurso ao ensaio de recuperação é possível afirmar que um método é sensível e específico quando se obtêm taxas de recuperação próximas de 100 %, fator que torna o método passível para futura aplicação. A percentagem de recuperação é calculada segunda a seguinte fórmula:

$$\text{Equação 4: } \eta (\%) = \left[\frac{C_f + C_a}{C_T} \right] \times 100$$

onde, C_f corresponde à concentração final, esta que engloba o volume da amostra adicional que foi acrescentado no ensaio, C_a corresponde à concentração da amostra e C_T corresponde à concentração esperada de analito aquando do término do ensaio.¹⁰⁸

2.5.3.3. Curva de calibração

As curvas de calibração, aplicadas em metodologias quantitativas, permitem a perceção da resposta de uma determinada forma de medição em função de uma concentração ou volume de amostra conhecido, onde se espera uma resposta linear. Para a determinação do perfil lipídico avalia-se a área do pico em relação à sua concentração aquando da injeção, sendo desenhada uma reta de calibração para cada um dos ácidos gordos, cuja quantificação se pretende acreditar.¹⁰⁴

O processo de calibração inicia-se com a preparação de uma série de soluções, cujas concentrações são rigorosamente conhecidas, estas seguem para medição sob as mesmas condições que as matrizes em estudo. O traçado gráfico do sinal do aparelho em função da concentração do padrão permite calcular a concentração das amostras em análise através de interpolação.¹⁰⁹ A curva resultante deve ser linear de modo a que a interpolação possa ser feita segundo o recomendado pela norma ISO 8466-1. A regularidade da execução da curva de calibração é facultativa, podendo o laboratório fazê-la todas as vezes aquando da análise ou esporadicamente. Como a regressão é uma função

polinomial de primeiro grau, espera-se que a distribuição de erros seja normal e que a homogeneidade de variâncias aconteça em toda a reta.¹⁰⁷

2.5.3.4. Estabelecimento da gama de trabalho

Para a definição da gama de trabalho é importante ter presente qual o modelo em que se pretende executar a calibração, isto é, se a calibração será linear ou polinomial. Para uma calibração linear, como será utilizada no presente método de avaliação do perfil lípido, Segundo o aconselhado pela norma ISO 8466-1, devem ser realizados cerca de 10 pontos de calibração, não devendo este valor ser inferior a 5, com uma distribuição homogénea pela gama de concentrações.¹¹⁰ A avaliação da adequação da gama de trabalho pode ser feita com base na aplicação de um teste de linearidade e homogeneidade da sua variância.¹⁰⁸

2.5.3.5. Linearidade

A avaliação da linearidade pode ser feita através de um modelo estatístico, segundo a norma ISO 8466-1, comumente designados por Teste de Mandel ou Snedecor/Fisher que, com base num conjunto de pares ordenados, permite a determinação da função de calibração linear assim como dos respetivos desvios padrão residuais: $S_{y/x}$ e S_{y2} . A diferença das variâncias (DS^2), que nos permite avaliar a linearidade, é calculada segundo a equação:

$$\text{Equação 5: } DS^2 = (N-2).S_{y/x}^2 - (N-3).S_{y2}^2$$

onde N corresponde ao número de padrões de calibração.¹⁰⁷ Posto isto, é determinado o valor de PG, que aquando da comparação com os valores tabelados pela distribuição F de Snedecor/Fisher permite perceber se a calibração até então realizada é linear. O cálculo de PG é feito mediante a seguinte equação:

$$\text{Equação 6: } PG = \frac{DS^2}{S_{Yy2}^2}$$

Se PG for inferior ou igual a F a função de calibração é linear, se for superior esta será não linear.¹¹⁰ Para a eventualidade de PG superior a F deve ponderar-se a redução da gama de trabalho.

A aplicação do teste de Rikilt permite também, uma avaliação da linearidade, uma vez que este teste analisa este parâmetro para cada ponto da reta, ou seja, para cada ponto da reta é calculado o $S_{y/x}$. Ao valor de $S_{y/x}$ médio é atribuída a percentagem de 100% e, a percentagem de cada desvio padrão residual calculado a partir deste valor médio. Na presença de uma condição de linearidade perfeita, o valor de cada percentagem de $S_{y/x}$ obtido para cada ponto deveria corresponder a 100%. Porém, para uma determinada gama de trabalho estabeleceu-se como aceitável uma variação de $\pm 10\%$, se os valores obtidos apresentarem variações superiores à estabelecida, devem ser rejeitados e gama de trabalho reduzida. A avaliação da linearidade pode ser realizada com base numa representação gráfica conjuntamente com a análise do coeficiente de correlação, contudo, é importante ter presente que este é um bom indicador de correlação, mas não reflete com clareza a linearidade. Quer a análise da gama de trabalho quer as análises da linearidade devem ser feitas numa fase inicial no processo de calibração, sobretudo, quando não é utilizada a gama de concentração referida na norma de ensaio, ou sempre que este estudo se verificar.¹⁰⁷

2.5.3.6. Limites analíticos de um método de ensaio

2.5.3.6.1. Limite de deteção (L.D.)

O limite de deteção corresponde ao valor mínimo para o qual ainda se deteta a presença do analito na amostra com algum rigor estatístico. Este fornece informação sobre a menor concentração de analito que o método permite detetar na amostra, apesar de não implicar, necessariamente, a sua quantificação com exatidão satisfatória.⁸² Esta variável pode ser determinada com base na seguinte equação:

$$\text{Equação 7: } L.D. = X_0 + 3,3 \times \sigma_0$$

onde, X_0 corresponde à média aritmética de padrões com concentrações vestigiais, em número entre 10 e 20, em que cada um deve ser cuidadosamente preparado, tendo em conta a sua aproximação com as condições reais de preparação da amostra, e a sua leitura deve ser feita ao longo de um período de tempo considerável.¹⁰⁸ Já σ_0 representa o desvio padrão de X_0 .

Quando o método implica a calibração linear, o limite de deteção é calculado da seguinte forma:

$$\text{Equação 8: } L. D. = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

onde, $S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da mesma.¹⁰⁶

2.5.3.6.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação define a menor concentração que permite a quantificação do analito em estudo, com uma precisão e exatidão satisfatórias. Usualmente, esta concentração corresponde ao padrão de menor concentração utilizado na reta de calibração.⁸⁴ A avaliação do limite de quantificação deve ser feita repetida e regularmente e, entre cada verificação, a variação entre os padrões usados e o sinal obtido não deve variar mais de 10%, mediante o recomendado pela IUPAC. O cálculo do limite de quantificação é obtido segundo:

$$\text{Equação 9: } L. Q. = X_0 + 10\sigma_0$$

Do mesmo modo que no parâmetro anterior, na eventualidade da calibração ser feita através de uma regressão linear, o limite de quantificação é calculado da seguinte fórmula:

$$\text{Equação 10: } L. Q. = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

2.5.3.7. Sensibilidade

A sensibilidade de um método de ensaio caracteriza-se pela sua capacidade para verificar pequenas variações que possam ocorrer na concentração do analito. Este parâmetro não depende apenas da natureza da amostra, nem se encontra intrinsecamente relacionado com uma etapa específica, a sensibilidade depende de um conjunto de fatores e de todos os passos envolvidos na análise, desde a manipulação da amostra para extração do analito até à análise propriamente dita, nomeadamente das características do equipamento utilizado, neste caso um cromatógrafo acoplado com um detetor de ionização da chama. A sua quantificação pode ser feita segundo:

$$\text{Equação 11: } \text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

onde, ΔL corresponde à variação do valor lido e ΔC à variação da concentração responsável por ΔC . A determinação do perfil lipídico, que é feita segundo uma calibração linear, prevê que a sensibilidade seja constante em toda a gama de trabalho e numericamente igual ao declive da reta de calibração.^{109, 111}

2.5.3.8. Precisão

A precisão permite a estimativa da distribuição de resultados entre determinações independentes. Esta pode ser executada para amostras iguais, semelhantes e até mesmo para padrões, contudo as condições de ensaio devem ser rigorosamente idênticas em todos. Com intuito da minimização dos erros que poderão estar associados a estes ensaios, a precisão deve ser determinada na matriz em análise, reduzindo deste modo, os seus efeitos. A precisão é definida com base em vários parâmetros, nomeadamente, a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia.^{107,112}

2.5.3.8.1. Repetibilidade

A avaliação da precisão passa pela determinação da repetibilidade de um método de ensaio, esta que se define como a precisão da metodologia, quando esta é realizada em condições análogas. Assim, e realçando a estabilidade de toda a execução experimental, prevê-se que a repetibilidade seja determinada no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes, com intervalos de tempo semelhantes e com uma série de medições superior a 10.¹⁰⁸ O limite de repetibilidade (r) estabelece numericamente o valor abaixo do qual, com uma elevada probabilidade, cerca de 95%, a variação entre duas medições consecutivas pode ocorrer:

$$\text{Equação 12: } r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96\sqrt{2} \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

sendo S_{ri} o desvio padrão de repetibilidade. A ocorrência de *outliers*, cuja determinação é fundamental à avaliação da precisão, pode ser determinada com base no teste de Grubb's. Para cada grupo de concentrações é possível associar um coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), expresso em percentagem:

$$\text{Equação 13: } CV_r(\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

onde S_{ri} representa o desvio padrão da repetibilidade e \bar{x} a média aritmética da repetibilidade obtida pela gama de trabalho escolhida.^{82,112}

2.5.3.8.2. Reprodutibilidade

Após a análise da repetibilidade é importante definir a reprodutibilidade de um determinado método experimental, já que esta define a precisão dos resultados obtidos sobre uma mesma amostra, porém, em condições de ensaio distintas. Assim, para a determinação deste parâmetro podem variar aspetos como: o laboratório, o analista, os equipamentos usados em todas as etapas e ainda realizados de forma esporádica.¹⁰⁷ Do mesmo modo que a repetibilidade, o limite de reprodutibilidade (R), estabelece o valor abaixo do qual, e com elevada certeza, cerca de 95%, a variação de duas medições consecutivas pode ocorrer:

$$\text{Equação 14: } R = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{rj} = 1,96\sqrt{2} \cdot S_{rj} = 2,8 \cdot \sqrt{S_{rj}^2}$$

onde, S_{rj}^2 representa a variância entre os resultados obtidos pela gama de trabalho definida.¹¹³ A cada gama de trabalho é possível a associação de um coeficiente de variação da reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem:

$$\text{Equação 15: } CV_r = \frac{S_{rj}}{\bar{x}} \times 100$$

onde S_{rj} representa o desvio padrão da reprodutibilidade e \bar{x} a média aritmética da reprodutibilidade obtida pelo conjunto de amostras escolhido.¹¹⁴

2.5.3.8.3. Precisão intermédia

Para completar o conjunto dos três parâmetros que definem e avaliam a precisão é importante perceber de que forma é que a precisão intermédia interfere com esta. A precisão intermédia representa a verificação da precisão, no mesmo laboratório ou em laboratórios distintos, utilizando o mesmo método, mas variando uma ou mais condições do método de ensaio. Portanto, é possível mudanças do operador, do equipamento, do tempo e do tipo de calibração, devendo ser realizadas pelo menos quinze medições sobre um padrão controlo. A variação da precisão intermédia, expressa em percentagem, deverá ser inferior a 20.^{113, 115}

2.5.3.9. Exatidão

A exatidão representa a consonância de resultados obtidos para uma amostra, ou série de amostras, e o valor de referência em vigor, para o mesmo ensaio e em condições análogas. Na série de resultados obtidos pressupõe-se a combinação de erros sistemáticos e aleatórios, logo, a exatidão resulta da interligação do uso dos materiais de referência certificados e ensaios interlaboratoriais.¹¹⁶

2.5.3.9.1. Materiais de referência certificados

Quando um laboratório tem o propósito de validar um determinado método, deve, obrigatoriamente, recorrer ao uso de materiais de referência certificados (MRC), estes que em conjunto com a medida de análise apresentam uma incerteza associada. A obtenção dos materiais de referência certificados deve ser feita junto de um organismo reconhecido e estes podem ser usados para a avaliação externa da qualidade de uma determinada análise.¹⁰⁷ A utilização deste tipo de materiais permite o reconhecimento do desempenho do laboratório, onde o valor obtido deve ser interposto com o valor tabelado, permitindo desta forma, a determinação do erro relativo associado e da exatidão da análise. O erro relativo é obtido a partir da seguinte equação:

$$\text{Equação 16: } E_r(\%) = \frac{X_{lab} - X_c}{X_c} \times 100$$

em que X_{lab} corresponde à média dos resultados obtidos experimentalmente e X_c ao valor certificado, ou seja, ao valor aceite como verdadeiro. Mediante o grau de exigência pretendido por cada laboratório este valor poderá variar, contudo, é recomendado pela IUPAC que este não seja superior a 5%.

Como mencionado anteriormente, a utilização de MRC permite a avaliação do desempenho, Z :

$$\text{Equação 17: } Z = \frac{X_{lab} - X_c}{S}$$

onde, S representa a incerteza associada ao MRC utilizado. A regra para aceitação do desempenho baseia-se na seguinte variação de valores:

- Se $|Z| \leq 2$ o desempenho do laboratório é aceite;

- Se $2 < |Z| \leq 3$ o desempenho do laboratório torna-se questionável e a sua aceitação irá depender dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais.
- Se $|Z| > 3$ o desempenho do laboratório não é aceite e este requer mudanças drásticas na execução e até mesmo nas metodologias aplicadas e que foram alvo de avaliação.^{107, 108}

2.5.3.9.2. Ensaios interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais são realizados entre laboratórios distintos e fornecem uma ferramenta adicional de controlo externo, podendo ser de vários tipos, mediante o intuito do laboratório que os sugere. No caso específico da validação da análise do perfil lipídico por cromatografia gasosa, irão realizar-se ensaios de normalização. Este tipo de ensaio interlaboratorial permite a comparação de valores como a reprodutibilidade e a repetibilidade, permitindo o seu controlo.¹¹²

2.5.3.9.3. Controlo de rotina

Quando o processo de validação é dado como concluído, é prioritária a definição de algumas atividades de regulamentação e verificação do método sendo imperativo o incremento de ensaios de rotina. Estes devem ser efetuados mediante uma periodicidade pré-estabelecida, por analistas devidamente preparados e os instrumentos de análise rigorosamente calibrados, permitindo o acompanhamento do desempenho da análise cada vez que esta é realizada, de forma a garantir que as condições nas quais o processo foi validado ainda se mantêm.¹⁰⁷

O processo de validação e acreditação de um método é extremamente moroso, perfeccionista e detalhado, pelo que a sua execução requer tempo e disponibilidade quer do analista quer do aparelho. Contudo, deve manter-se sempre os ensaios sobre o rigor desejado e em condições que permitam a sua repetição em ambiente rotineiro, sem que a análise se afaste da realidade acreditada. Assim, com a conclusão deste objetivo, uma das características exíguas do trabalho anterior, a falha na determinação de ácidos gordos de cadeia longa, pôde ser então corrigida, permitindo ao laboratório a vantagem de conseguir a determinação de ácidos gordos numa gama maior de comprimentos de onda.

Capítulo 3 – Enquadramento do trabalho

Objetivos do trabalho a realizar

Como o porco é um animal monogástrico, isto é, de digestão simples espera-se que a alimentação a que este é submetido se reflita no seu metabolismo, nomeadamente, a nível muscular. Deste modo, é expectável que uma manipulação adequada da dieta se manifeste positivamente nas características e composição musculares. Posto isto, o presente trabalho visa perceber qual o impacto do *Mega Sense*, após a sua introdução na dieta, na carne de porco após o seu abate. O *Mega Sense* que se propõem a uma atividade antioxidante elevada, foca-se exclusivamente nos processos oxidativos que acontecem no músculo e que promovem a sua perda de qualidade. Assim, é imperativo perceber qual a eficácia do produto na redução oxidativa e como a sua ação introduz melhorias nutricionais e organoléticas na carne final que chega ao consumidor. Adicionalmente, é importante compreender de que forma parâmetros como a cor, atividade da água, conteúdo lipídico, entre outros, são afetados pela introdução deste aditivo na dieta. Com recurso a várias técnicas como GC-FID, TBARS, estudos microbiológicos, medições de pH, de a_w e humidade pretende-se avaliar as características organoléticas e nutricionais do produto de carne final. Este estudo, que se direciona para a carne suína, será aplicado nas raças mais comercializadas em Portugal, neste caso os animais sob observação resultam do cruzamento Pietrain x Landrace+Large White e o lombo curado oriundo do porco Bísaro.

Adicionalmente ao estudo do *Mega Sense*, pretende-se também durante este trabalho iniciar a validação do método de análise do perfil lipídico com recurso a GC, para futura acreditação. Este projeto adicional incorre pela necessidade de complementação do projeto inicial, isto porque, a determinação do perfil lipídico apresentava inúmeras falhas nomeadamente, a incapacidade de separação de ácidos gordos de cadeia longa ou a má separação de ácidos gordos com tempos de retenção muito próximos. Assim, serão obtidos de forma rigorosa ácidos gordos para uma maior gama de concentrações, o que, resultará num aperfeiçoamento do método. O processo estatístico implicará o desenvolvimento de curvas de calibração para cada um dos padrões de ácidos gordos que se pretendem determinar, onde se procurará a linearidade e os limites analíticos. A precisão e a exatidão do método serão também estabelecidas, estas visam não só a avaliação do método, demonstrando se este se enquadra segundo os parâmetros de aceitação de organismos como a IUPAC, como a perceção do desempenho do laboratório na execução do método de análise que se propõem para acreditação.

Capítulo 4 – Material e métodos

4.1 Processo de obtenção das amostras

No presente trabalho as amostras de carne provenientes do músculo *longissimus* foram fornecidas pela empresa Porminho, que num ambiente controlado, relativamente à temperatura e quantidade de ração fornecida aos porcos, submeteu 90 animais à ingestão de *Mega Sense* e colocou outros 90 sob as mesmas condições, porém, sem que houvesse a ingestão do produto. Este último grupo será, portanto, o grupo de controlo positivo. Face a questões de confidencialidade impostas pela empresa, não é possível detalhar a quantidade de *Mega Sense* administrada, contudo, este foi introduzido na dieta cerca de um mês antes do abate e em baixas quantidades quando comparado com a constituição final da ração.

Já as amostras de lombo curado, foram fornecidas pela quinta do Porco Bísaro onde, o procedimento relativo à alimentação dos animais foi semelhante, porém os grupos, onde ocorreu a suplementação e o controlo, não foram alimentados ao mesmo tempo. O conjunto de porcos onde existiu adição do produto, para uma tonelada de ração ingeriu cerca de 3 quilogramas de produto, também, cerca de um mês antes do abate. Inicialmente, foi alimento o grupo de controlo e em seguida o suplementado com *Mega Sense*, isto para garantir que, a carne que irá integrar o processo de transformação deriva exclusivamente do grupo que se pretende estudar. O processo de cura do lombo estendeu-se por 5 meses e o detalhe com que este processo foi realizado não pode aqui ser exposto, pois o lombo curado, assim como toda a carne de porco Bísaro, possui a denominação de origem protegida (DOP), pelo que a empresa procura o máximo sigilo face a quaisquer alterações que introduzem na carne.

4.2. Classificação e identificação de carnes e produtos cárneos

O enquadramento de cada tipo de produto analisado na categoria adequada foi realizado com base na norma NP 588:2008. Esta identificação, efetuada em ambiente industrial, é determinante para as metodologias de análise que poderão ser posteriormente aplicadas.

No presente trabalho foram analisados dois tipos de amostras. O primeiro, a carne fresca, recolhida 24 horas após o abate do animal, insere-se no grupo das carnes picadas já que este foi o processo tecnológico predominante a que foi submetido, dado que a sua trituração facilita a sua manipulação para análise. Para além da carne fresca, foram também analisadas carne congelada, com uma semana de congelação, e carne cozida em

água fervente, estes dois grupos de amostras partiram da recolha da carne fresca. O segundo grupo, o lombo curado, define-se, segundo a norma, como um produto à base de carne, já que este foi submetido a sucessivos processamentos que tornam inviável a identificação de carne fresca no momento de corte. A sua classificação como produto curado resulta da salga da carne fresca, em condições ótimas, que permitam uma diminuição controlada e gradual da humidade e, a ocorrência de processos fermentativos e enzimáticos. Estes processos causam alterações suficientes no produto que lhe conferem características organolépticas distintivas e que permitem a garantia da sua preservação e salubridade à temperatura ambiente usual.

4.3. Preparação das amostras para posterior análise

Inicialmente, antes da aplicação de qualquer ensaio, as costeletas do lombo de porco frescas, congeladas, previamente descongeladas, e cozinhadas e os lombos curados foram devidamente triturados (triturador R-3-plus 3000, Robot Coupe®) e guardados hermeticamente em frasco de plástico de 120 mL e refrigeradas a 5°C.

4.4. Medição do pH em carnes frescas e lombos curados

A medição do pH para ambas as amostras foi realizada segundo um método potenciométrico de acordo com a norma NP 3441:2008. Após calibração do medidor de pH, recorrendo a duas soluções tampão padrão de pH conhecido (Panreac AppliChem ITW), com diferentes pH, previamente compradas. O pH de cada amostra triturada foi medido utilizando um eletrodo symPHony-SB7OP desenvolvido pela VWR™, medindo diretamente o pH da amostra, com aproximação de 0,01 unidades. Os dados adquiridos refletem a média de dois valores obtidos num mesmo ponto da amostra.

4.5. Determinação da atividade específica da água (a_w)

Para determinação da atividade específica da água, a_w , segundo a metodologia prevista no documento 978.18 definido e validado pela AOAC *international*, foi utilizado um higrómetro, o hycroPalm desenvolvido pela Rotronic. A amostra, previamente triturada, foi colocada no recipiente de leitura do aparelho e, em seguida, colocada a coluna de leitura da a_w sobre o mesmo. Após estabilização do aparelho, realizaram-se duas medições por amostra.

4.6. Determinação do teor de humidade

De acordo com a norma NP 1614-1:2009, foi pesada uma massa de areia tratada, três ou quatro vezes superior à massa da amostra, para um cadinho de alumínio no qual foi ainda adicionada uma vareta de vidro; este aparato foi colocado durante um período de 30 minutos numa estufa (Binder) a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, num exsiccador a arrefecer à temperatura ambiente. De seguida, foram pesadas cerca de 5 g de amostra triturada para o cadinho, a qual foi intimamente misturada com a areia com auxílio da vareta. Este foi colocado na mesma estufa, durante 2 horas, e, posteriormente, num exsiccador à temperatura ambiente. Após arrefecimento o cadinho foi pesado e o procedimento de secagem e pesagem foi repetido até a diferença entre duas pesagens consecutivas, distanciadas por uma hora de aquecimento, ter sido inferior a 0,1% do valor da amostra pesada.

4.7. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

A determinação do grau de oxidação presente nas amostras foi efetuada através da determinação espectralométrica das espécies capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, de acordo com a Norma NP 3356:2009.

Para a realização deste método prepararam-se as seguintes soluções:

- 1) Solução de galato de propilo (98%, Acro Organics) a 5% (m/V) em álcool etílico 96% (AGA);
- 2) Solução de ácido tricloroacético (VWR BDH Chemicals) a 7,5% (m/V), com EDTA (PanReac) a 0,1% (m/V), em água destilada;
- 3) Solução de ácido tiobarbitúrico (98%, Acro Organics) 0,02 mol/L em água destilada;
- 4) Soluções padrão de 1,1,3,3-Tetraetoxipropano a 10^{-5} mol/L e 10^{-8} mol/L em solução de ácido tricloroacético a 7,5% (m/V).

A preparação e extração da amostra foram realizadas do seguinte modo: para um erlenmeyer de 200 mL foram pesadas cerca de 15 g da amostra devidamente triturada, e adicionados 30 mL de solução de ácido tricloroacético a 7,5% (m/V). De seguida, a mistura foi homogeneizada durante 10 minutos, na posição 4, num homogeneizador orbital OS-500-VWR. Por fim, a amostra foi filtrada com recurso a papel de filtro para um copo de vidro e utilizada nas análises seguintes.

A determinação das espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico foi feita mediante o próximo procedimento:

Para um tubo de ensaio, foram pipetados 2,5 mL de extrato (filtrado da mistura homogeneizada), acrescentado 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético 7,5% (TCA) e 5,0 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 mol/L (TBA). A preparação do branco foi semelhante à da amostra, porém, a quantidade que corresponde à amostra foi substituída por TCA. Relativamente à curva de calibração, foram preparadas cinco concentrações padrão, com 1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL e 5,0 mL da solução TEP 10^{-8} mol/L, preparada em (4). A cada um destes volumes foi adicionada a quantidade de TCA necessária para perfazer 5,0 mL e, por fim, acrescentados 5,0 mL da solução de TBA. Posto isto, os tubos de ensaio, devidamente rolhados, foram colocados num banho, em água fervente, durante 40 minutos e, depois, em água tépida e regularmente agitados até ao momento de leitura. A determinação da absorvância, realizada quando as soluções se encontravam à temperatura ambiente, foi efetuada com recurso a um espectrofotómetro, UV-3100PC VWR®, para um comprimento de onda de 530 nm.

5.6. Análise da cor através do método CIE L*a*b*

A cor das carnes frescas, congeladas e cozinhadas foi determinada com base no sistema tricromático L*a*b*, estabelecido pela *Commission Internationale de L'Éclairage*, CIE, em 1986, com recurso a um colorímetro, Konica Minolta CM-700d, cuja área de análise é de aproximadamente 8 mm. Assim, inicialmente foi feita a calibração do aparelho, através do branco de calibração e em seguida o auto-zero. Para cada amostra foram realizadas três medições em locais diferentes, cada uma destas medições foi feita em triplicado e os valores obtidos para cada um dos parâmetros resultam da média de três valores determinados no mesmo local.

4.9. Análise do perfil lipídico com recurso a GC-FID

A análise de ácidos gordos foi realizada de acordo com as normas em vigor ISO 12966-1:2015, ISO 12966-2:2015 e ISO 12966-4:2015.

4.9.1. Preparação dos ésteres de metilo para análise

4.9.1.1. Preparação da amostra para análise – Hidrólise ácida

Para um copo de vidro de 200 mL foram pesadas $5 \pm 0,001$ da amostra triturada, este que é o peso da amostra utilizado para os cálculos do teor de matéria gorda livre, e

adicionados 100 mL de solução aquosa de HCl a 50% (V/V). De seguida, a mistura foi aquecida em banho de areia, a 50°C, durante uma hora. Posto isto, a amostra foi filtrada para um copo de 100 mL, com recurso a papel de filtro que no seu interior continha Celite® 545 (VWR Chemicals) e bem lavada com água destilada.

4.9.1.2. Determinação do teor de matéria gorda livre

Este processo foi iniciado com a pesagem do balão de fundo redondo, utilizado para extração, que havia sido previamente aquecido numa estufa (Binder) a 103°C±2°C, durante aproximadamente 30 minutos. De seguinte, a amostra contida no papel de filtro, devidamente seca, foi colocada dentro do cartucho e este colocado na coluna de extração do aparelho de Soxhlet (Gerhart GmbH & Co. KG) e, pelo topo desta, adicionado éter de petróleo, num volume correspondente ao dobro da capacidade da coluna de extração. O aparato foi então submetido a aquecimento em refluxo durante 6 horas, a uma temperatura constante. Posteriormente, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo e, o balão, ao qual foram adicionados 2 mL de acetona, que promovem a secagem mais rápida do extrato, nomeadamente exclusão de resíduos do solvente. Este foi depois colocado na estufa a 103°C±2°C, durante uma hora. Após arrefecimento este foi pesado, o procedimento de secagem e pesagem foi repetido até a diferença entre duas pesagens consecutivas, distanciadas por uma hora de aquecimento, ter sido inferior a 0,1% da massa de amostra pesada em 4.9.1.1.

4.9.1.3. Preparação dos ésteres de metilo para análise GC-FID

Após pesagem do balão obtido em 4.9.1.2., foram adicionados 6 mL da solução metanólica de hidróxido de potássio 0,5 M e, após fervura, 7 mL da solução metanólica de trifluoreto de boro (BF₃) 1,3 M. Foi montado um condensador e a mistura aquecida à ebulição, sob refluxo, durante 3 minutos. Seguidamente, foram adicionados 5 mL de isoctano e 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio, cuja concentração poderá ser variável, pois apenas se pretende a saturação da solução para que a separação de fases seja ideal. A mistura foi transferida para um tubo de vidro onde foram acrescentados 10 mL de cloreto de sódio concentrado, verificando-se uma separação de fases. Com recurso a uma pipeta de Pasteur, foi transferida a porção pretendida, a superior, para um outro tubo de plástico, com tampa.

4.9.1. Análise por GC-FID

Para a análise por GC-FID utilizou-se uma coluna ZB-FFAP de 30 metros, com 0,25 mm de diâmetro (Zebron™), acoplada a um cromatógrafo Clarus 500 (Perkin Elmer).

A injeção da amostra foi feita manualmente através de uma seringa de 1 µL (Hamilton Co.). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 270 °C, temperatura do detetor 245 °C, com a temperatura do forno 1 minuto a 75 °C, aumentada a 17 °C/min até 155 °C, mantida a esta temperatura durante 2 min, aumentada a 3 °C/min até 180 °C, mantida a esta temperatura durante mais 4 min, aumentada até 220 °C a 40 °C/min e mantida a esta temperatura durante 18 min. Utilizou-se H₂ como gás de arraste, a uma pressão de 9,3 psi, com um fluxo de 0,69 mL/min, e um fluxo split de 1:100.

4.10. Avaliação microbiológica do lombo curado

4.10.1. Preparação das amostras

A realização desta etapa do procedimento de análise microbiológica foi efetuada com base na norma ISSO 6887-1: 2017 (E). Deste modo, para um saco de plástico esterilizado foram pesadas 25g ± 0,02g da amostra, não triturada, e acrescentado o meio diluente APT (Anexo 1), num volume nove vezes superior à massa pesada. A solução foi colocada num homogeneizador peristáltico, Seward-Stomach 400 – Lab system, e deixada a repousar, à temperatura ambiente, até se iniciarem as análises seguintes.

De modo a preparar as diluições subsequentes, foi pipetado 1 mL da solução da amostra homogeneizada para um tubo de ensaio já com 9 mL do diluente previamente adicionado. Este processo de diluição foi realizado para todas as diluições que se pretendiam analisar.

4.10.2. Contagem de Microrganismos totais

A execução desta metodologia teve como base a norma ISO 4833-2:2013 (E). Com uma pipeta esterilizada foram transferidos 0,1 mL da diluição preparada em 5.9.1 para meio de PCA (Anexo 1-a) em placas de Petri. O inóculo foi cuidadosamente espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de um espalhador, e cada placa foi incubada a 30°C±1°C durante 72h±3h (estufa Memmert). Com o auxílio de um leitor de placas, Colony Counter (IUL Instrument), foi realizada as contagens dos microrganismo, para cada placa a contagem foi feita para apenas um quadrante da placa

pois, a quantidade de colónias era elevada, e extrapolado este valor para os quatro quadrantes da placa.

4.10.3. Detecção, enumeração e confirmação de *Listeria monocytogenes*

Mediante o pressuposto pela norma ISSO 11290-1:2017, para um saco plástico esterilizado foram pesadas $25\text{g}\pm 0,01$ da amostra e adicionados 225 mL do meio half-Fraser, Anexo 1-b, que se encontrava à temperatura ambiente. O saco contendo a amostra e o meio foi homogeneizado e incubado a $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h}\pm 1\text{h}$. Após incubação, a amostra foi inoculada em placas de Petri com meio PCA, com recurso a uma ansa de repicagem, as placas foram incubadas invertidas, numa estufa, Memmert, a 37°C durante $48\text{h}\pm 2\text{h}$. Após 24 horas de incubação, as placas de petri foram analisadas, com o intuito de verificar a presença de *L. monocytogenes*, esta que se caracteriza pelo surgimento de colónias azúis-esverdeadas com um halo opaco circundante. Posto isto, é feita a enumeração das colónias através de contagem, que pode ser efetuada sem recurso ao contador.

Da placa, onde presumivelmente existiria *L. monocytogenes*, foram isoladas, cuidadosamente, 2 colónias, para a etapa da confirmação. De seguida, com recurso a uma ansa de repicagem, foi traçado um risco, numa placa de agar enriquecida com peptonas e fatores de crescimento específicos para a bactéria. No caso de se verificar a presença da *L. monocytogenes*, ocorrerá a mudança de cor do meio, de vermelho para amarelo, com desenvolvimento adicional de um halo opaco em redor do traço feito para cada colónia.

4.10.4. Detecção e contagem de *Staphylococcus aureus*

O meio Baird Parker, (Anexo 1-c), foi transferido para placas de Petri que, em seguida, foram incubadas durante $24\text{h}\pm 1\text{h}$ a $3^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir da diluição inicial preparada em 4.10.1 foram transferidos 0,1 mL para o meio de cultura anteriormente preparado, distribuindo o inóculo por toda a superfície com auxílio de um espalhador. Esta etapa foi repetida para mais 3 diluições, partindo sempre da diluição anterior à que se pretendia determinar. As placas foram colocadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e, de seguida, invertidas e colocadas na estufa a $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h}\pm 2\text{h}$. Com o auxílio de um leitor de placas, Colony Counter (IUL Instrument), foram marcadas as colónias atípicas e voltadas a incubar nas mesmas condições durante $24\text{h}\pm 1\text{h}$.

4.10.5. Quantificação de Bolores e Leveduras

Através da norma ISO 21527-2:2008 foi realizada a metodologia que permitiu detectar a presença destes microrganismos nas amostras para análise. Assim, para placas de Petri preparadas com APT e DG18 (Anexo 1-e), foram transferidos 0,3 mL da diluição inicial, preparada em 4.10.1, para 3 placas, o procedimento foi repetido para todas as diluições que se pretendiam avaliar. Por fim, as placas foram incubadas durante $72\text{h}\pm 2\text{h}$. Posto isto, com o auxílio de um leitor de placas, Colony Counter (IUL Instrument), foram contabilizados os bolores e leveduras em cada placa, esta distinção foi viável dada a aparência díspar destes dois componentes.

4.10.6. Detecção de *Salmonella*

Este procedimento foi realizado segundo a norma ISO 16140:2003. A amostra foi preparada de forma semelhante à descrita em 4.10.1 e o saco foi colocado a incubar durante $18\text{h}\pm 2\text{h}$ a $41,5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em seguida, transferiram-se 0,1mL da solução incubada para uma placa de agar, preparada com PCA e com meio de enriquecimento MSR/V (Anexo 1-f), a qual foi novamente $24\text{h}\pm 2\text{h}$ a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 24 horas de incubação, a deteção da bactéria foi realizada com recurso à análise qualitativa das placas de petri, onde foi verificada a sua ausência ou presença, esta ação foi efetuada sem recurso ao contador.

4.10.7. Detecção e quantificação de *Escherichia coli*

Com base na norma ISO 16649-2:2001 e partindo da diluição feita em 4.10.1 foram pipetados 1 mL da amostra para placas de Petri e a inoculação foi feita em duas placas para cada diluição. Seguidamente adicionaram-se cerca de 15 mL de meio TBX (Anexo 1-g), corretamente qual foi homogeneizado com o inoculado. As placas solidificaram à temperatura ambiente, e, de seguida, foram invertidas e colocadas a incubar a 44°C durante $24\text{h}\pm 2\text{h}$. Posto isto, a deteção da *E.coli* foi efetuada pela verificação do crescimento de colónias na placa de petri, sempre que este crescimento aconteceu as placas foram submetidas a contagem através do leitor de placas, Colony Counter (IUL Instrument).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.1. Alimentação com o *Mega Sense*

O *Mega Sense* foi introduzido na dieta dos animais em estudo cerca de um mês ou três semanas antes do abate, já que a probabilidade da sua incorporação aumenta, dado o desenvolvimento do sistema digestivo do animal. Este produto tecnológico foi integrado na mistura que é administrada ao animal, esta que se apresentou rica em cereais como trigo, cevada e soja. Face ao mencionado na revisão bibliográfica este tipo de produtos contribui sobretudo, para um aumento de ácidos gordos polinsaturados, acontecimento que poderá ser mais ou menos favorável à qualidade da carne. Isto é possível, uma vez que, existe a possibilidade de haver um aumento da concentração de ômega-3 na carne, surgindo assim melhorias nutricionais, relativamente à vertente menos favorável, com o aumento da propensão oxidativa do músculo, o desequilíbrio redox instala-se promovendo a perda de atributos qualitativos desejáveis.¹¹⁷ Todavia, a presença do *Mega Sense* pretende antagonizar este processo oxidativo, promovendo a manutenção da qualidade como veremos em seguida, já que se espera a absorção máxima a nível intestinal pois, o produto é hidrossolúvel e resiste a todo o processo digestivo, e, portanto, a sua incorporação e transporte até ao músculo esperam-se facilitadas.¹¹⁸

5.2. Efeito da alimentação com *Mega Sense* sobre a cor da carne

A cor da carne de porco, um dos componentes sensoriais de maior destaque, é um dos principais influenciadores de compra, dado que, é associada com a presença ou ausência de frescura.

No presente trabalho, foram analisadas costeletas provenientes do músculo *longissimus*, cujo metabolismo não pode ser determinado com exatidão já que variações como o peso do animal, grau de obesidade, genética restringem as quantidades quer de fibras glicolíticas, quer de oxidativas e/ou intermediárias. Assim, com base na análise rudimentar do seu aspeto, é possível a aferição ambígua do tipo de metabolismo que o animal em análise apresenta. Neste caso, a carne fresca obtida pelo cruzamento Pietrain x (Landrace x Large White), surge com uma cor vermelha carregada, pelo que se pode assumir que o tipo prevalecente de fibras são as oxidativas de contração lenta. Deste modo, o ambiente oxidativo é proeminente e a possibilidade de desregulações é elevada, com forte tendência para o desenvolvimento de metamioglobina a partir de oximioglobina.¹¹⁹ Contudo, a constituição muscular não permanece igual com o abate do

animal, já que, durante o processo *postmortem* são várias as alterações bioquímicas a que está sujeita. O pH, com a morte do porco, inicia o seu declínio, cuja taxa e extensão irão determinar a capacidade da carne para refletir e/ou absorver luz e, portanto, irá influenciar a cor que esta apresenta.¹²⁰ Todavia, a variação deste parâmetro ocorreu entre valores considerados normais e aceitáveis, 5,6-5,8, e, portanto, não se identificou a presença de condições DFD nem PSE, estas que são fortemente influenciadas pelo pH, como foi mencionado anteriormente.^{53,121}

A cor das amostras foi determinada com recurso ao método CIE L*a*b*, introduzida pela comissão internacional da cor em 1931, que perspetiva a cor como um sistema tricromático, composto por três coordenadas: pela clareza, L*, variações entre o vermelho e o verde, a*, e variações entre o azul e o amarelo, b*. As leituras foram efetuadas para amostras com 24 h após o abate (denominadas por amostras refrigeradas), para amostras após uma semana de congelação (amostras congeladas) e para amostras após cozedura, em água fervente, a 110 °C durante cerca de 35 min.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos (valores médios de três determinações para cada amostra) para a carne obtida de animais alimentados ou não com *Mega Sense*. Para cada gama de trabalho existiu um grupo controlo, onde os animais abatidos não ingeriram *Mega Sense* em qualquer fase de crescimento, permitindo que mediante os resultados possa ser perceptível o efeito deste produto.

Com a presença do *Mega Sense* espera-se que a manutenção da cor seja maior, ou seja que a carne permaneça vermelha durante mais tempo, com a mioglobina na forma de oximioglobina (MbO₂). Na figura 9, são comparados os valores do parâmetro a*, na presença e ausência do produto. Estes valores foram submetidos a uma análise estatística *t-student* para amostras não emparelhadas, com um intervalo de confiança de 95%. Na figura 9, existe uma tendência positiva, para valores de a* na presença do produto, nomeadamente quando estas foram cozinhadas ou congeladas, p<0,05, o que pode ser indicador do efeito do *Mega Sense*. Para as amostras refrigeradas esta tendência não se verificou, o que poderá ser reflexo da frescura da carne no momento de análise, dado que, o tempo *postmortem* ainda não era suficiente para que as taxas oxidativas sejam tais que promovam alterações a nível da mioglobina e outros constituintes musculares.¹²²

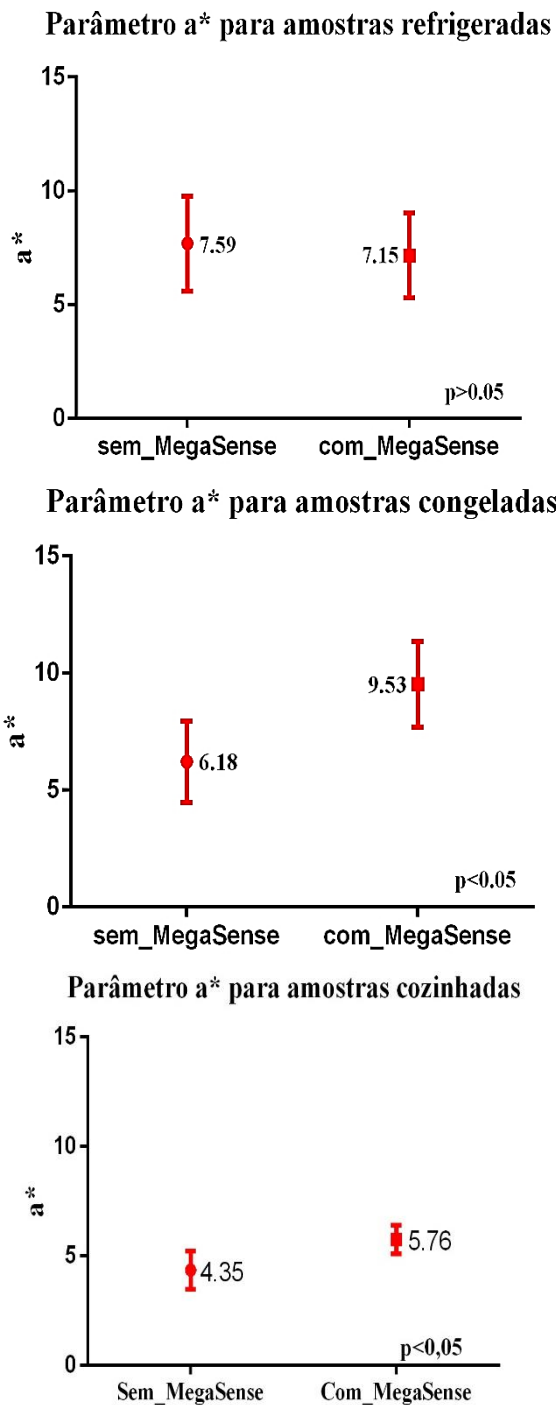


Figura 9 - Comparação do parâmetro a* na ausência e na presença do Mega Sense entre várias amostras. Através da análise estatística, t-student para um intervalo de confiança de 95%, é possível verificar que apenas para as amostras refrigeradas a diferença entre o parâmetro a* não é estatisticamente significativa. Já para as amostras congeladas e cozinhadas existe uma diferença significativa, $p < 0,05$, entre a presença e ausência do Mega Sense, sendo tendencialmente positiva para a ação esperada do produto.

A ação protetora do produto é corroborada por vários autores isto porque, a sua constituição à base de vitamina E, taninos e compostos fenólicos, se assemelha aos compostos avaliados por estes. Contudo, é importante ter presente que, a quantidade de amostras não permite uma conclusão estruturada acerca da ação do produto, no entanto, é visível a tendência positiva para tal.

O parâmetro a* relaciona-se com variações de cor entre o vermelho e o verde, sendo a cor vermelha a procurada pelo consumidor e que é representada por valores de a* ligeiramente elevados, superiores a 5. Phillips et al. (2001)⁴⁹ relacionou o estado de oxidação da mioglobina com a variação do critério a*, tendo verificado que para diferentes taxas oxidativas, a mudança na conformação deste pigmento resultava em variações nos valores de a*, onde o seu aumento era promovido por baixas taxas oxidativas e a sua diminuição por valores oxidativos elevados. Neste estudo, a presença de oximioglobina foi associada a valores de a* superiores a 5, enquanto que valores baixos foram relacionados com a ausência de oximioglobina e prevalência de metamioglobina ou com a ligação da mioglobina a compostos como nitratos e/ou nitritos que tornam a carne esverdeada. Este estudo encontra-se em concordância

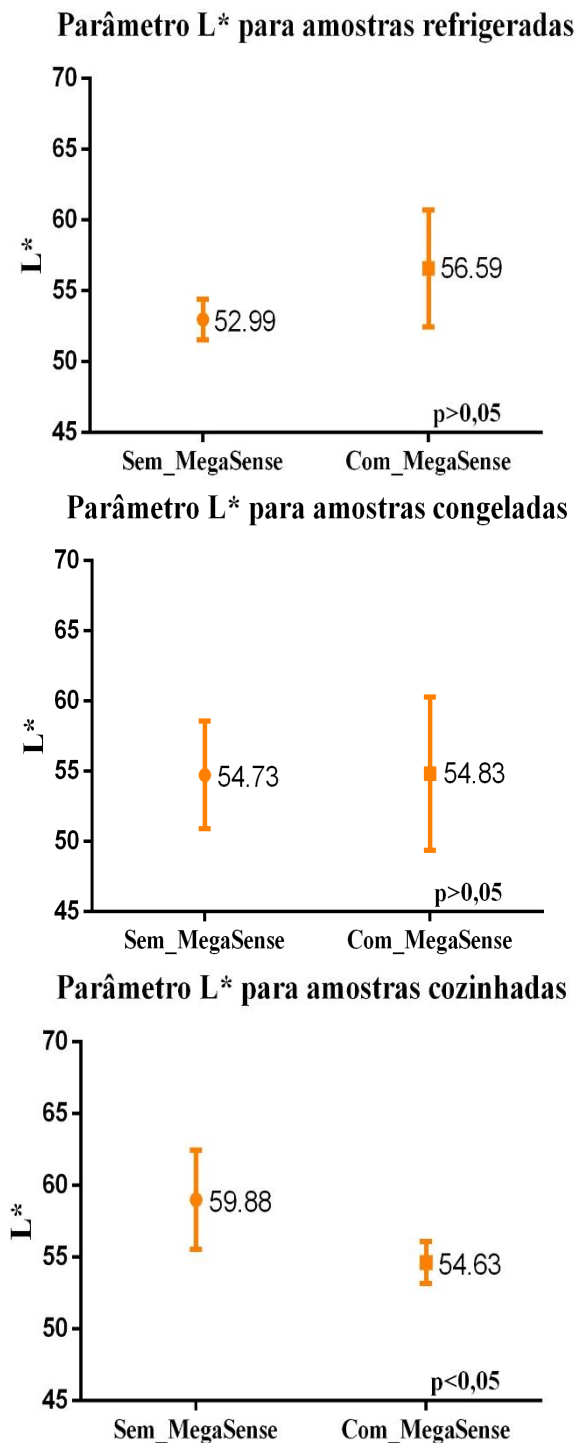


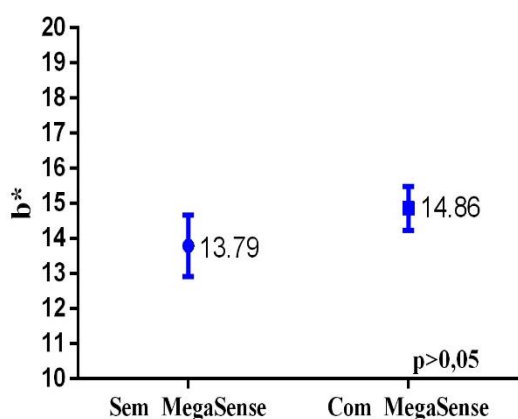
Figura 10 - Comparação do parâmetro L* na ausência e na presença do Mega Sense entre várias amostras. Através da análise estatística, t-student para um intervalo de confiança de 95%, é possível verificar que para as amostras refrigeradas e congeladas a diferença entre o parâmetro L* não é estatisticamente significativa. Já para as amostras cozinhadas existe uma diferença significativa, $p < 0,05$, entre a presença e ausência do Mega Sense, sendo tendencialmente positiva para a ação esperada do produto.

com os resultados que obtidos para a atividade do *Mega Sense*, pois em ambos se verificaram baixas taxas oxidativas, que parecem promover valores de a^* desejáveis.

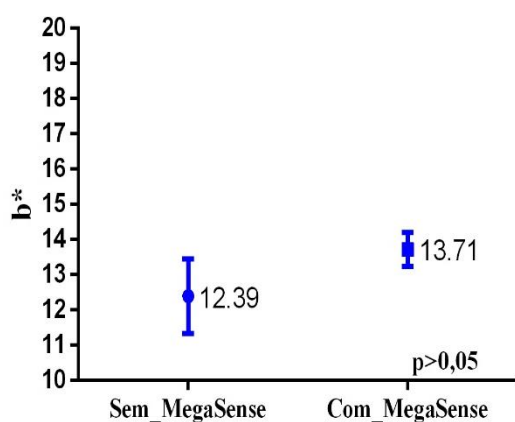
O parâmetro L*, que quantifica a luminosidade da peça de carne, permite perceber o estado qualitativo da mesma, já que as variações dos seus valores estão associadas com o desenvolvimento de carnes DFD e PSE. A conjugação dos parâmetros a^* e L* permite uma avaliação da qualidade da carne, pois, através do parâmetro a^* conseguimos avaliar o aspeto e com o L* perceber se alguma situação extrema se estabeleceu. Usualmente, os valores de L* surgem com uma faixa de variação que delimita as características do músculo após o abate. Assim, para valores de L* muito superiores a 50 a carne é considerada PSE, onde se espera uma luminosidade excessiva dada a palidez adquirida, valores muito inferiores a 44 resultam de carne DFD, com luminosidade baixa dada a escuridão que a carne adquire, enquanto idealmente os valores de L* devem situar-se entre os 44 e 50.^{123,32}

Na Figura 10 são apresentados os valores obtidos para o parâmetro L*, para as amostras de carne em estudo. Os valores obtidos para este parâmetro em todas as gamas de amostra é superior a 50,

Parâmetro b* para amostras refrigeradas



Parâmetro b* para amostras congeladas



Parâmetro b* para amostras cozinhadas

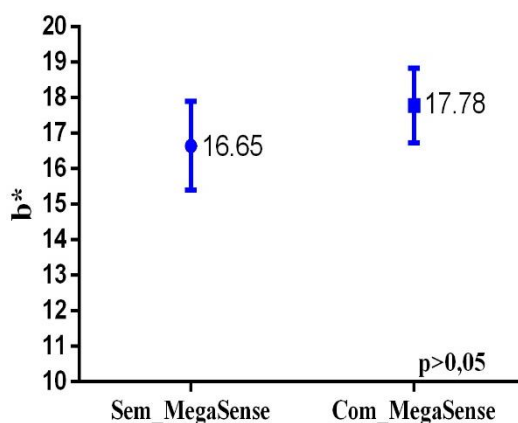


Figura 11 - Comparação do parâmetro b* na ausência e na presença do Mega Sense entre várias amostras. Através da análise estatística, t-student para um intervalo de confiança de 95%, é possível verificar que para as amostras refrigeradas e cozinhadas a diferença entre o parâmetro b* não é estatisticamente significativa. Já para as amostras congeladas existe uma diferença significativa, $p < 0,05$, sendo tendencialmente positiva para a ação esperada do produto.

porém os valores apresentados previamente como padrão representam uma média baseada na literatura. Deste modo, embora superiores os valores de L* não refletem a presença de carne PSE, pois a esta superioridade numérica não é substancial. Verifica-se que a variação de L* só é relevante nas amostras cozinhadas, $p < 0,05$, aumentando para a carne dos animais alimentados com *Mega Sense*. Contudo, este critério de análise não está diretamente relacionado com o ambiente oxidativo que pode ocorrer na carne, já que este depende sobretudo do potencial glicolítico que se instala no processo *postmortem*, dependendo, essencialmente, do pH, como será abordado em diante.

Do mesmo modo que o L*, também os valores de b* não se encontram diretamente relacionados com as taxas oxidativas que possam estar a ocorrer na carne, em qualquer que seja a fase de análise a que esta esteja submetida. Com base na observação da figura 11 verifica-se que em nenhuma das amostras os valores médios de b* são significativamente superiores na presença de *Mega Sense* na dieta, porém, em todas as amostras existe uma tendência positiva para estes valores serem mais elevados, quando comparados com os valores médios calculados para as amostras obtidas na ausência do produto na dieta. A variação positiva dos valores de a*, nas carnes

congeladas e cozinhadas poderá ser reflexo da ação antioxidante do *Mega Sense*, já que, na sua presença se espera uma proteção aumentada ao grupo hémico desta proteína.

O parâmetro b^* , que descreve a variação entre o azul e amarelo, promove uma percepção visual da variação de pH, já que se encontra diretamente relacionado com este. Apesar dos parâmetros L^* e b^* não se relacionarem diretamente com o ambiente oxidativo a que a carne possa estar submetida, podem ser influenciados por produtos e intermediários desses processos.¹²⁴ Comumente, estes critérios de análise de cor relacionam-se sobretudo com o pH e as características metabólicas do músculo. Porém, o pH, como será analisado em seguida, quando elevado, promove a auto-oxidação da mioglobina e a consequente alteração da cor.⁵³ Assim, estes parâmetros apesar de não nos permitirem perceber a eficácia do *Mega Sense* enquanto antioxidante e promotor da qualidade da carne, permitem uma previsão do estado qualitativo da carne.

Em suma, o sistema tricromático $L^*a^*b^*$ permite-nos uma avaliação quantitativa da cor, o que é útil na medida em que permite perceber variações que, até para avaliadores sensoriais experientes e especializados são difíceis de perceber. O parâmetro a^* é, de entre os três, aquele que se relaciona diretamente com a oxidação a que o músculo possa ser sujeito, uma vez que reflete o estado oxidativo da mioglobina, o principal pigmento responsável pela cor.¹¹⁹ A figura 10 permite perceber que na presença do *Mega Sense* na dieta, a variação de a^* foi sempre favorável, o que demonstra a possível eficácia deste como agente antioxidante e como agente protetor da mioglobina. O facto de este parâmetro se manter elevado para amostras congeladas e cozinhadas, torna o produto interessante para indústrias de processamento já que a carne se mantém apelativa durante mais tempo. Todavia, é importante ter presente que um aspeto demasiado vermelho na carne cozinhada pode induzir o consumidor em erro e fazer com que este cozinhe a carne durante mais tempo, podendo colocar em causa toda a qualidade da carne. Deste modo, é possível concluir que o *Mega Sense* exerce uma ação positiva na cor da carne, promovendo a sua boa aparência, com potencial para prolongar o tempo de prateleira.

Tabela 4 - Parâmetros L*, a*, b* obtidos através do método CIE para amostras de carne refrigerada, congelada e cozinhada, obtidas a partir de animais alimentados ou não com *Mega Sense*

	<i>Carne refrigerada^a</i>			<i>Carne congelada^b</i>			<i>Carne cozinhada^c</i>		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
SM_1 ^d	54,86	6,83	14,37	49,18	8,66	11,14	56,25	3,57	14,78
SM_2	52,62	8,90	13,35	55,54	5,02	12,90	62,67	3,88	17,10
SM_3	51,38	9,83	14,67	56,33	4,94	11,97	61,26	4,42	17,25
SM_4	53,11	5,20	12,79	57,89	6,26	13,56	55,88	5,54	17,47
<i>Média</i>	52,99	7,59	13,79	54,73	6,18	12,39	59,01	4,35	16,65
<i>s</i>	1,44	2,08	0,88	3,83	1,74	1,06	3,46	0,86	1,25
CM_1	59,45	5,18	15,30	54,66	8,19	14,12	53,31	6,57	19,36
CM_2	54,62	7,54	14,06	62,42	8,57	13,22	54,98	5,06	17,32
CM_3	60,54	6,35	15,42	52,49	9,17	13,37	53,67	5,94	17,30
CM_4	51,76	9,54	14,66	49,74	12,19	14,15	56,55	5,46	17,16
<i>Média</i>	56,59	7,15	14,86	54,83	9,53	13,71	54,63	5,76	17,78
<i>s</i>	4,12	1,86	0,63	5,45	1,82	0,49	1,47	0,65	1,05
<i>SE^e</i>	NS ^f	NS	NS	NS	p<0,05 ^g	NS	p<0,05	p<0,05	NS

^a – A carne refrigerada foi analisada 24 horas após o abate podendo assim, ser considerada como carne fresca;

^b – A carne congelada foi analisada após uma semana de congelação, tendo sido congelada imediatamente depois do abate e descongelada à T ambiente;

^c – A carne cozinhada resultou de um processo de congelação paralelo ao da carne congelada onde, em seguida a um processo de descongelação à T ambiente, esta foi cozinhada a 110°C durante ≈ 35 minutos;

^d – Cada um dos valores discriminados resulta da média de 3 medições, em que cada resulta de uma análise triplicada efetuada pelo aparelho;

^e – SE – Significância estatística;

^f – NS – Não significativo, p>0,05, para a análise estatística t-student, num intervalo de confiança de 95%;

^g – p<0,05, estatisticamente significativo, para a análise estatística t-student, num intervalo de confiança de 95%.

5.3. Efeito da incorporação do *Mega Sense* na dieta sobre o pH da carne

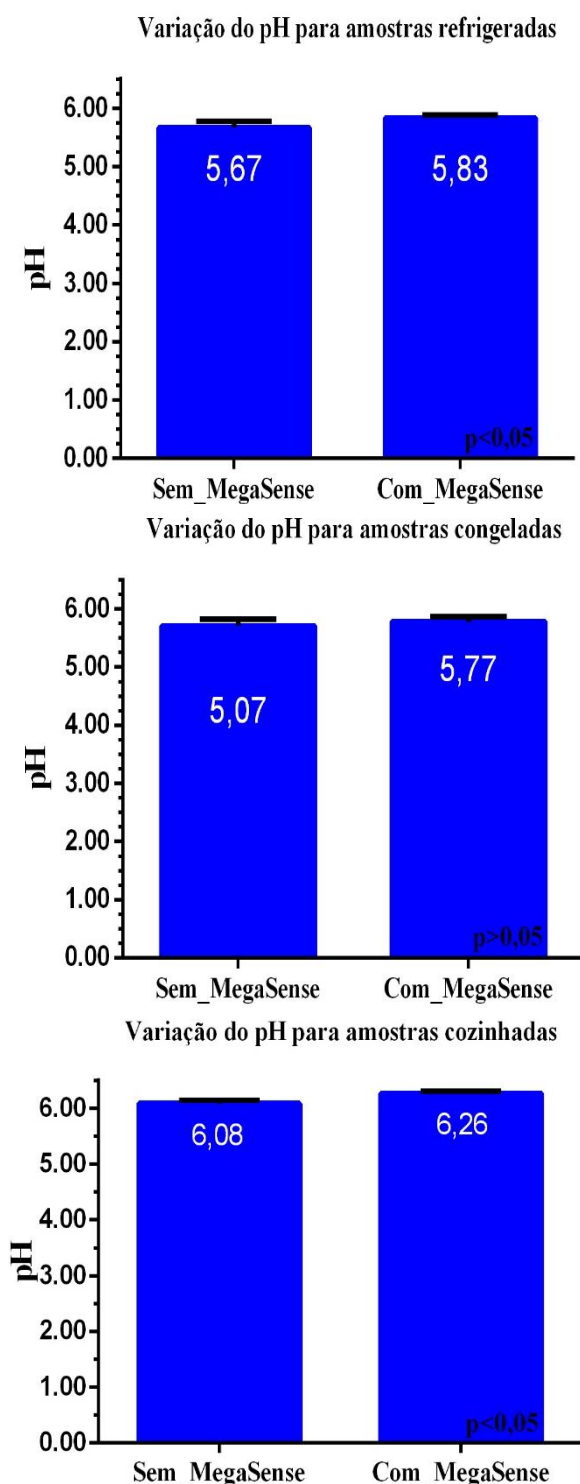


Figura 12 - Variação do pH na presença e ausência de *Mega Sense* da dieta, para (a) amostras de carne refrigeradas, (b) amostras de carne congelada e (c) amostras de carne cozinhada. Através da análise estatística, t-student para um intervalo de confiança de 95%, é possível verificar que para as amostras congeladas a diferença entre o pH não é estatisticamente significativa. Já para as amostras refrigeradas e cozinhadas existe uma diferença significativa, $p < 0,05$, entre a presença e ausência do *Mega Sense*, sendo tendencialmente positiva para a ação esperada do produto

Como já discutido na revisão bibliográfica, a variação do pH e a taxa ou velocidade do seu declínio são acontecimentos fundamentais para a qualidade da carne, estes encontram-se intrinsecamente relacionados com o metabolismo *postmortem*. O valor que o pH atinge, durante o processo pós-abate, em conjugação com a temperatura da carcaça são determinantes para o desenvolvimento positivo de parâmetros qualitativos como o gotejamento da peça de carne, a cor e textura.¹²¹Neste trabalho, a determinação do pH foi realizada para carnes de animais alimentados com e sem o *Mega Sense*, este parâmetro foi também determinado para o lombo curado obtido a partir de porcos em condições semelhantes aos anteriores, existindo, portanto, sempre um grupo controlo, onde não ocorreu a ingestão do produto. Através da análise da figura 12, onde são expostos os resultados obtidos, é possível verificar que a inclusão do *Mega Sense* na dieta promoveu um aumento significativo do pH ($p < 0,05$) para as carnes refrigeradas e cozinhadas, enquanto que para as carnes congeladas não se um efeito significativo ($p > 0,05$). Apesar de nas amostras congeladas não existir uma significância estatística, verifica-se uma tendência positiva na presença do *Mega Sense*. A conjugação dos valores de pH

obtidos com os valores de L* discriminados na secção anterior permite concluir que em nenhum dos grupos se verificou a ocorrência de carnes DFD ou PSE, e, portanto, a carne avaliada encontrava-se dentro dos parâmetros qualitativos recomendados, não havendo conclusões erróneas influenciadas por estas condições.¹²⁵ Direcionando o foco para as amostras sujeitas a refrigeração, a diferença de pH na ausência e na presença de *Mega Sense*, $5,67 \pm 0,01$ e $5,83 \pm 0,01$, respetivamente, onde estes valores representam a média obtida a partir de todas as amostras analisadas, em cada uma das gamas, permite que sejam retiradas algumas elações relativamente à influência do produto na qualidade da carne fresca.

Parâmetros como a cor ou a capacidade de retenção de água são, fortemente influenciados pelo pH, como foi abordado ao longo da introdução, porém, é importante perceber qual o papel do *Mega Sense* sobre o pH e o seu impacto a nível qualitativo. Na presença do produto o pH é superior, facto que irá dificultar a oxidação da mioglobina, pois a penetração do oxigénio na superfície é dificultada pela compactação das fibras musculares, resultado do pH final que a carne atingiu.¹²⁶ Os valores b* e L* são superiores, $p < 0,05$, para os valores de pH mais elevados, algo que se revela concordante com o estudo realizado por Brewer et al (2001)¹²⁷ onde este compara vários sistemas de mediação da cor e os relaciona com variações de vários parâmetros qualitativos, incluindo o pH. Assim, no presente trabalho verifica-se uma correlação positiva e expectável entre o parâmetro L*, que evidencia a luminosidade da carne, e o pH, já que para valores mais elevados se espera uma refletância maior, dada a organização fibrilar.¹²⁰ Do mesmo modo, para o parâmetro b* que permite a previsão dos valores de pH, se verifica esta correlação, uma vez que estes valores, ainda que não significativamente estatísticos, apresentam uma tendência positiva, demonstrando-se superiores. Contudo, apesar da relação entre estes dois parâmetros, é importante realçar que o *Mega Sense* não contribui, pelo menos em primeira instância para os valores de pH, porém, este poderá exercer uma ação protetora sobre a mioglobina, pois, a promoção de um pH ácido resultado da produção de ácido láctico culmina num ambiente oxidativo mais rigoroso, podendo ser despoletada a oxidação da mioglobina, figura 13. É importante ressaltar que, embora o pH influencie indiretamente as taxas oxidativas da carne, já que a protonação da oximioglobina, promovida sobretudo por variações associadas a este aspeto tecnológico, leva à produção de espécies reativas de oxigénios, o seu contributo para o impacto da oxidação na qualidade da carne não é considerável. No entanto, o decréscimo de pH não

foi suficiente para que estes tipos de conjecturas possam ser verdadeiras, já que este foi analisado 24 horas após o abate e se revelou, para ambas as gamas, dentro dos valores considerados padrão.¹²⁸ Deste modo, não podem ser feitas conclusões sobre o mecanismo de ação do produto e as alterações da cor que poderão ter sido provocadas por influência do pH.

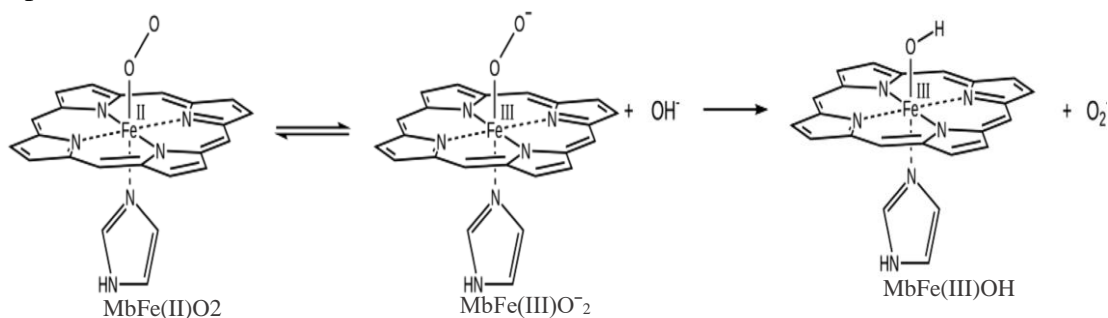


Figura 13 - Oxidação da oximioglobina. Para pH baixos existe uma propensão substancial para a oxidação da mioglobina, um processo que poderá, contudo, ser reversível. Todavia, se o processo prosseguir ocorre a formação de metamioglobina e do anião superóxido, aumentando as taxas oxidativas. Consequentemente, a carne escurece e perde visivelmente a qualidade. (Imagem adaptada: Arcon J.P. et al. (2015)).

Relativamente às amostras congeladas, é possível verificar que, apesar de $p > 0,05$, as amostras provenientes de animais cuja a alimentação inclui o *Mega Sense*, revelam valores superiores aquelas que advêm de porcos com dietas não suplementadas, $5,77 \pm 0,01$ e $5,71 \pm 0,01$, respetivamente. Para os valores de pH superiores verificaram-se a^* , b^* e L^* também superiores. Conquanto, os valores de L^* não são explicados exclusivamente por variações na luminosidade, resultado da variação do pH, ou por variações no estado de oxidação da mioglobina, resultado quer do pH final quer do ambiente oxidativo a que este pigmento possa estar exposto. Do processo de congelação resulta, normalmente, um acastanhamento ténue da carne, resultado da evaporação dos cristais de gelo que se formam à superfície da peça, durante o armazenamento, e que dão lugar a pequenas bolhas de ar que dispersam a luz resultando, sobretudo, num valor de L^* maior.¹²⁹ Não obstante, se este tempo de armazenamento for muito prolongado, mais de duas semanas, o escurecimento da peça acontecerá com maior impacto e não só devido à evaporação dos cristais como à oxidação da mioglobina, que após este período acontece em elevada escala.¹²⁷

Quando submetidas ao calor a mioglobina sofre, assim como todas as proteínas, um processo de desnaturação, onde, acaba por perder os seus atributos e funções. Assim, carnes submetidas a processos de aquecimento, como a cozedura em água realizada no

presente trabalho, apresentaram valores de a^* mais baixos, facto que verificou nos dois grupos, com e sem aditivo, mas que apresentou maior impacto na sua ausência.⁵² A carne cozinhada surge com um pH final superior na presença do *Mega Sense*, $6,28 \pm 0,01$, quando comparado com o obtido na sua ausência, $6,08 \pm 0,01$, e para os quais, $p < 0,05$, valores que revelam concordância quer com b^* quer L^* obtidos para cada um dos grupos. As carnes com valores de pH mais elevados, apresentam a^* superiores, ocorrência que mais uma vez pode derivar quer do impedimento da penetração do oxigénio quer da atividade antioxidante do produto, mas que, também pode ser explicada com base na proteção da mioglobina ao processo de desnaturação resultado de pH superiores a 6,1. Posto isto, é possível concluir que, existe uma relação entre o pH e a cor, que se verifica através da análise destes parâmetros obtidos na realização experimental do presente trabalho, porém, nada se pode concluir sobre o efeito do *Mega Sense* no pH. O *Mega Sense* pode, de forma indireta, atenuar os efeitos do pH que poderão promover um ambiente oxidativo, contudo, não exerce qualquer impacto na forma como este poderá variar.

A capacidade de retenção da água, parâmetro que será discutido em seguida, não é exclusivamente, influenciado pelas modificações que o pH poderá sofrer. A capacidade de retenção de água aumenta com o aumento do pH, principalmente quando este varia para valores superiores a 5,5, mediante a seguinte possibilidade: à medida que este valor aumenta, afasta-se do ponto isoelétrico das proteínas e, portanto, a capacidade destas para complexarem com a água não é afetada, reduzindo o gotejamento. Porém, à medida que este valor diminui, para além da desnaturação proteica, dá-se o compactação fibrilar que resulta numa redução de espaço, promovendo o gotejamento.⁵³ Assim, analisando o gráfico da figura 13 é espectável que para os grupos de carnes de animais alimentados com *Mega Sense*, em qualquer uma das condições, a capacidade de retenção de água seja superior, ainda que, como discutido ainda nesta secção, não se preveja qualquer impacto do produto na variação do pH.

Em suma, para valores de pH menos acídicos, que variem entre 5,0-6,0, segundo, Pulkrábek J. et al. (2004)¹²⁰, espera-se uma qualidade da carne superior, facto verificado para todos os grupos em estudo no presente trabalho, contudo na presença do produto espera-se uma qualidade superior. Esta expectativa é baseada na suposição de que, para valores de pH ligeiramente mais elevados, atributos como a cor ou gotejamento se consigam manter estáveis e ótimos durante um período de tempo superior, fator bastante

vantajoso para a indústria de retalho e processamento de derivados. Portanto, para as amostras que derivam de animais que ingeriram o *Mega Sense*, espera-se uma qualidade superior, tendo por base os valores de pH, que se verificaram favoráveis na sua presença, que ao promoverem um ambiente favorável para que haja maior controlo metabólico da qualidade e conjugarem a sua ação com a do *Mega Sense*, propiciam o surgimento de carne de alta qualidade.

5.4. Efeito da integração do *Mega Sense* na dieta sobre a atividade da água e a humidade

A humidade e a atividade da água, como abordado na revisão bibliográfica, são parâmetros que ilustram a presença de água na carne. A humidade, no presente trabalho, é considerada a quantidade de água total presente na amostra, e a sua determinação consiste na variação de peso após secagem, ou seja, quanto maior este valor maior a quantidade de água presente que acaba perdida para a atmosfera. Relativamente à atividade da água esta representa a água que não se encontra quimicamente ligada a nenhum composto ou adsorvida a algum componente e que, se pode considerar livre encontrando-se disponível para participar em vários processos químicos e biológicos, incluindo reações químicas, enzimáticas e crescimento microbiológico.¹³⁰ A variação destes parâmetros, que poderão revelar-se prejudiciais para a qualidade, pode resultar de alterações de outros parâmetros qualitativos como o pH e taxas oxidativas, como será discutido em seguida.

Na Figura 14 apresentam-se os valores calculados de a_w e teor de humidade para as amostras de carne em estudo. Como se pode apurar na Figura 14 (A), a atividade da água não apresentou variações estatisticamente significativas, $p > 0,05$, em nenhum dos grupos estudados, independentemente da incorporação do *Mega Sense* na dieta. As amostras refrigeradas, surgem com valores médios de $0,97 \pm 0,01$ e $0,99 \pm 0,01$, na ausência e presença de produto, as amostras congeladas apresentam valores de $0,95 \pm 0,01$ e $0,98 \pm 0,01$ e as cozinhadas $0,96 \pm 0,01$ e $0,98 \pm 0,01$. A análise destes valores permite verificar que para além das variações na presença e ausência do aditivo alimentar não terem sido significativas, a comparação entre grupos também não apresenta diferenças substanciais. Como referido anteriormente, a atividade da água reflete toda a água no estado livre, que se encontra aprisionada na estrutura muscular, nomeadamente a nível miofibrilar, assim, apenas as variações a nível estrutural poderão surtir efeito neste critério qualitativo. A partir dos dados para a cor e pH foi possível determinar a

inexistência das condições PSE e DFD e, portanto, concluir que a integridade e coesividade muscular permaneceu em todos os grupos, incluindo após o processo de

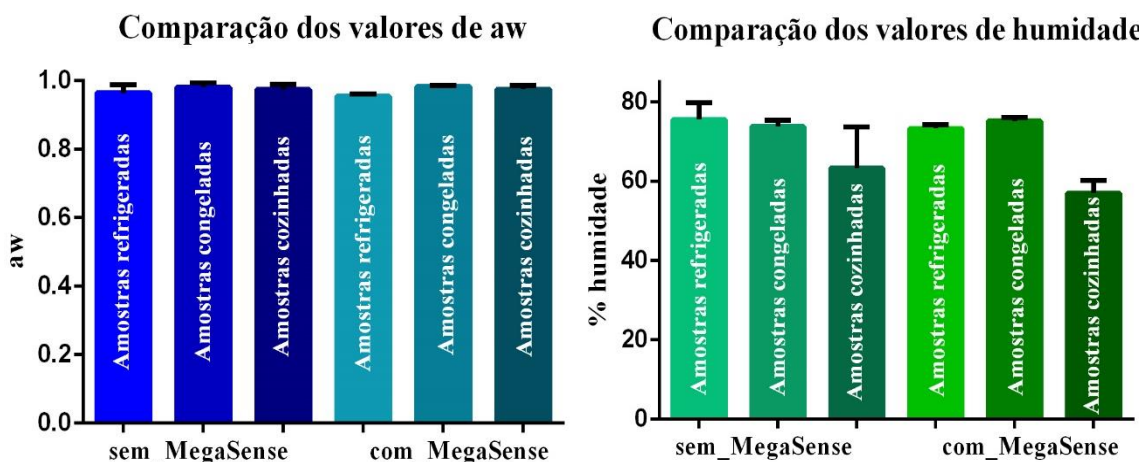


Figura 14- Comparação dos resultados adquiridos quer para a atividade da água quer para a humidade, para grupos de amostras obtidos a partir de dietas não suplementadas e suplementadas com Mega Sense. Através da análise dos gráficos é possível verificar que, nas amostras onde ocorreu a adição do produto, existe uma tendência para os valores de a_w e da humidade serem superiores, com a exceção das amostras congeladas relativamente à humidade. Quando submetidos ao teste estatístico t-student, com um intervalo de 95% de confiança, estes grupos de amostras não apresentaram relevância estatística, $p > 0,05$ para os valores de a_w . Para a humidade existe significância em todas as comparações entre grupos.

congelação e cozedura, onde as variações rigorosas de temperatura, poderiam causar impactos negativos sobretudo na organização das fibras, que poderiam culminar numa movimentação da água aí existente. A presença do *Mega Sense* não parece surtir qualquer efeito significativo sobre este parâmetro, verifica-se uma tendência para os valores de atividade da água serem superiores, algo que pode revelar a sua ação na manutenção da integridade das fibras, porém nada fortemente relevante, que permita uma conclusão segura sobre o verdadeiro papel do produto em possíveis alterações do parâmetro.¹³¹

Os valores de humidade obtidos (Figura 14(B)) revelam que os grupos de carnes provenientes de animais, cuja a alimentação inclui o *Mega Sense*, tendem a apresentar valores de percentagem inferiores, com a exceção das amostras congeladas que na presença do produto apresentou valores superiores, relativamente aos controlos, grupos onde não ocorreu a ingestão de produto, com significância estatística, $p < 0,05$. As amostras refrigeradas surgem com valores médios de humidade de $75,51\% \pm 0,01\%$ e $73,25\% \pm 0,01\%$, onde $p < 0,05$, para dietas ausentes de suplementação e dietas suplementadas, respetivamente. Leygonie C. et al (2012)¹²⁹ constatou que as perdas de água, através de humidade, durante processos de cozedura aconteciam de forma semelhante à refrigeração e congelação, porém estas perdas eram superiores face ao efeito

que a temperatura exerce sobre os constituintes musculares, nomeadamente, proteínas, fibras, membranas. No presente trabalho, os valores de humidade obtidos para as amostras cozinhadas foram inferiores aos restantes, $63,27\% \pm 0,01\%$ e $57,02\% \pm 0,01\%$ para o controlo e animais suplementados, respetivamente, onde $p < 0,05$, facto que se encontra concordante com a literatura. A determinação da humidade permite uma aproximação da capacidade de retenção, já que esta avalia a perda de água por secagem, e, portanto, a água que foi perdida.²⁹ Fatores como o pH influenciam fortemente a capacidade de retenção de água já que estes promovem a desnaturação proteica, quer através do alcance do seu ponto isoelétrico, quer pelo desenvolvimento de um ambiente ácido severo, comprometendo a capacidade das proteínas para complexarem com a água, através de ligações eletrostáticas, por exemplo. É importante ressaltar que, a temperatura a que as amostras são submetidas promove também a desnaturação proteica, o grau em que acontece depende do estado dos parâmetros qualitativos da carne.¹³¹ Assim, valores de pH mais elevados estão associados a uma maior capacidade de retenção e, consequentemente, a valores de humidade maiores, acontecimento, que não se verifica, quer para as amostras refrigeradas, quer para as cozinhadas, onde no grupo alimentado com o produto, o pH surge superior ao grupo controlo.¹³⁰ A presença do *Mega Sense*, não se revela vantajosa para a diminuição das perdas de água por gotejamento, já que os valores de humidade não refletem o comportamento esperado. Isto porque, em ambientes oxidativos, a propensão para a perda de estrutura membrana é elevada pois, a possibilidade de ataque por parte de agentes oxidantes aos fosfolípidos de membrana é iminente o que, resultará, consequentemente, na perda de fluído membranar ocorrendo, o desenvolvimento de exsudado. Assim, na presença deste produto tecnológico deveria ocorrer a proteção membranar, advinda da sua ação antioxidante, acontecimento que, através da análise dos valores de humidade não se comprovou. A ação a que o produto se propõe não protege a carne do impacto temperatura de cozedura, nomeadamente, a nível da desnaturação proteica ou perda de estrutura membranar face ao calor, porém poderá protegê-la das taxas oxidativas exorbitantes que se podem estabelecer, acontecimento que poderá explicar os valores obtidos para a humidade.^{36, 52}

Com o processo de congelação o desenvolvimento de cristais de gelo ocupa mais espaço e, portanto, a haverá água que será expulso, o que resulta numa maior perda de água por gotejamento, do mesmo modo, o processo de descongelação também afeta a produção de exsudato, contudo se este for realizado rapidamente esta perda não é tão

substancial. Assim, para as amostras congeladas os valores de humidade obtidos foram de $73,77\% \pm 0,01$ e $75,22\% \pm 0,01$, onde, $p < 0,05$, na ausência e presença do produto na dieta. Era expectável que o valor obtido para o grupo onde ocorreu a alimentação com o *Mega Sense* fosse superior ao do grupo controlo, grupo onde não ocorreu a ingestão do produto. Estes valores correspondem a uma capacidade de retenção de água superior, já que após secagem, a diferença de peso se revelou maior, o que revela que, no momento antes da análise a carne proveniente de uma alimentação com *Mega Sense* detinha maior teor de água.¹²⁷

Apesar de a análise microbiológica das amostras de carne fresca, congelada e cozinhada não ter sido realizada é importante ter presente que para uma atividade da água elevada, a contaminação microbiológica torna-se mais suscetível de acontecer.¹³² A perda de carne ou derivados por contaminação microbiológica é bastante recorrente já que o crescimento destes microrganismos acontece numa gama alargada de pH e para valores de a_w próximos de 1,00.¹²⁰ Não obstante, a humidade e a atividade da água são fundamentais para a avaliação da qualidade da carne pois permitem a previsão, por exemplo, do tempo de prateleira de uma determinada peça de carne, da sua estabilidade metabólica, já que com o aumento do gotejamento aumentam os níveis de oxidação lipídica e proteica e da adequação da embalagem. No presente trabalho, o estudo destes dois parâmetros foi inconclusivo relativamente à afirmação de que: qualidade da carne, onde esta se verifica superior na presença do *Mega Sense*. Porém, a conclusão de que a presença do produto na dieta do animal é responsável pela melhoria de algumas características face à variação da humidade e atividade da água não é correta. Para existir total veracidade nesta afirmação seria necessária uma avaliação específica e direcionada da ação do produto sobre estes parâmetros.

5.5. Análise microbiológica e efeito da incorporação do *Mega Sense* na dieta

A análise microbiológica, no presente trabalho, foi realizada exclusivamente para as amostras de lombo curado provenientes de dois conjuntos de animais, correspondendo um dos grupos ao controlo, onde não existiu a suplementação da dieta com *Mega Sense*, e o restante ao grupo de estudo que foi submetido a uma dieta suplementada com o produto, permitindo-se assim, a comparação do efeito deste aditivo. O crescimento microbiológico, em qualquer alimento, é condicionado por parâmetros como a

temperatura, atividade da água, humidade e pH, assim, de modo a permitir uma sustentação dos resultados obtidos, estes foram apresentados nesta secção (Tabela 5).

Com o intuito de facilitar a compreensão da tabela e a discussão em torno da mesma, as amostras provenientes do grupo, cuja a alimentação do animal não inclui o *Mega Sense*, surgem com a sigla LSM seguidas pelo número de amostra, e as que advêm do grupo, onde o produto foi incluído na dieta, identificam-se por LCM com o número da amostra em seguida. O comportamento microbiológico apresenta-se bastante semelhante nos dois grupos de amostras existindo, contudo, algumas diferenças nomeadamente, a presença de *Listeria monocytogenes* em alguns dos lombos da gama de controlo, particularmente: LSM-3, -5, -8, -10, -11, -15 e -19, o que reprova a possibilidade da sua exposição para venda, uma vez que, segundo o Regulamento Nº 2073/ 2005 da Comissão Europeia, a existência deste microrganismo deve ser nula ou inferior a 100 UFC/g em determinados alimentos, nomeadamente cárneos, impossibilitando o seu consumo sobretudo por lactantes ou gestantes. Relativamente à *Salmonella spp*, que se encontra ausente nos dois grupos, à *E. coli*, que se encontra dentro dos limites previstos pela lei, $<1,0 \cdot 10^1$ UFC/g, e à *Staphylococcus aureus*, cujos valores são semelhantes aos das bactérias coliformes, não se verificam diferenças substanciais entre as duas gamas em comparação, assim, de acordo com o regulamento, estas amostras, com a exceção das que contém *Listeria monocytogenes*, são presumíveis para venda, já que os valores se encontram dentro dos limites legislados. É importante atribuir especial destaque aos bolores e leveduras, uma vez que, apesar de os valores obtidos serem elevados, não são absurdos, pois é comum neste tipo de produtos a utilização de culturas de arranque, como diversas leveduras, cuja discriminação não pode ser feita dada a proteção do processo de cura, e bolores que providenciam características organolépticas únicas ao produto.¹³² A presença de leveduras e bolores promove a lipólise originando vários ácidos gordos livres que devido à sua volatilidade, contribuem para o desenvolvimento de aromas e sabores característicos no lombo.¹³³ Estas culturas são adicionadas com o intuito de melhorar aspetos como o sabor, aroma e textura do produto tornando a sua ingestão bastante agradável ao consumidor.

O processo de cura do lombo, independentemente da origem da carne, isto é, se o animal foi ou não alimentado com *Mega Sense*, promove fortes alterações em vários parâmetros qualitativos, acontecimento este que poderá justificar a verosimilhança de resultados obtidos para os grupos de amostras.⁵⁸ Atentando no pH, que varia para valores mais acídicos devido à adição de hidratos de carbono, como a sacarose e/ou frutose, já

que estes promovem uma maior produção de ácido láctico, que se revela promotor de sabores e tenrura característicos, a presença do aditivo alimentar a esta altura do processamento pode, com grande probabilidade, não surtir qualquer efeito na amostra.⁶⁶ Posto isto, em análise à tabela 6, verifica-se um pH médio, para as amostras da gama LCM, de $5,35 \pm 0,01$, este que é ligeiramente inferior ao obtido para a gama LSM: $5,42 \pm 0,01$, diferença para a qual, $p > 0,05$, e, portanto, não existe significância estatística. Relembrando as elações presentes na secção correspondente à avaliação do efeito do *Mega Sense*, enquanto complemento da dieta, no pH, não se espera uma ação do produto sobre este. Este suplemento apresenta como foco a proteção antioxidante por isso, este poderá revelar efeito positivo relativamente ao ambiente oxidativo promovido pelo decréscimo do pH. Todavia, esta possível frente de ação do *Mega Sense*, até ao momento trata-se apenas de uma conjectura, pois no presente trabalho, apesar de ter sido avaliado o efeito antioxidante do produto, não foi especificado o seu centro de atividade. Assim, esta pequena variação pode resultar da utilização de maiores quantidades de aditivos alimentares, como por exemplo, açúcares ou, até mesmo, do processamento a que o lombo é submetido. Deste modo, a aproximação de resultados, relativos à microbiologia, que se verifica para as duas gamas de amostras pode refletir a diferença mínima de pH entre os dois grupos.²⁷ Porém, é necessária a avaliação dos parâmetros como a atividade da água e a humidade, pois o crescimento microbiano é, também, condicionado por estes parâmetros. O crescimento microbiológico é influenciado pela humidade e, sobretudo, pela atividade da água. Os valores de a_w e humidade, presentes na tabela 5 e, para quais se verifica significância estatística, $p > 0,05$, foram para LSM: $0,978 \pm 0,001$ e $45,16\% \pm 0,01\%$ e para LCM: $0,949 \pm 0,001$ e $46,67\% \pm 0,01\%$. As amostras da gama LCM apresentam um a_w médio inferior ao obtido para a gama LSM, porém valores de humidade superiores, o que significa que as perdas de água foram superiores. Contudo, seria expectável que para este grupo de amostras, cuja a suplementação da dieta ocorreu, os valores de a_w fossem dada a sua atividade, espera-se uma maior capacidade de retenção de água por parte da peça.¹³⁴

Tabela 5 – Análise microbiológica do lombo curado na presença e ausência do *Mega Sense*, com comparação dos valores de pH, a_w e humidade, para um intervalo de 95% de confiança

<i>Microorganismo</i>	<i>Salmonella spp</i>	Bolores (UFC/g)	Leveduras (UFC/g)	<i>Contagem MOs</i>	<i>Escherichia Coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>pH</i>	a_w	Humidade (%)
<i>Amostra</i>										
LSM_1 ^a	Ausente	3,0*10 ¹	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,72	0,981	36,49
LSM_2	Ausente	1,6*10 ²	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,32	0,958	46,05
LSM_3	Ausente	6,0*10 ²	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Presente	5,23	0,982	45,62
LSM_4	Ausente	>1,5*10 ⁴	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,48	0,979	50,42
LSM_5	Ausente	>1,5*10 ¹¹	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Presente	5,54	0,979	50,42
LSM_6	Ausente	>1,5*10 ⁴	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,37	0,979	48,75
LSM_7	Ausente	>1,5*10 ⁴	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,74	0,979	40,89
LSM_8	Ausente	>1,5*10 ⁴	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Presente	5,39	0,979	47,37
LSM_9	Ausente	>1,5*10 ⁴	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,30	0,979	49,81
LSM_10	Ausente	1,0*10 ²	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Presente	5,54	0,979	39,04
LSM_11	Ausente	<1,0*10 ³	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Presente	5,42	0,979	37,00
LSM_12	Ausente	3,0*10 ¹	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,31	0,979	45,08
LSM_13	Ausente	1,6*10 ²	>1,5*10 ⁴	>3,0*10 ⁵	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,50	0,979	48,81

LSM_14	Ausente	$6,0*10^2$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,40	0,979	48,51
LSM_15	Ausente	$>1,5*10^4$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Presente	5,35	0,979	49,87
LSM_16	Ausente	$>1,5*10^{11}$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,26	0,979	36,22
LSM_17	Ausente	$>1,5*10^4$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,55	0,979	39,17
LSM_18	Ausente	$>1,5*10^4$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,28	0,979	45,00
LSM_19	Ausente	$>1,5*10^4$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Presente	5,23	0,979	46,44
LSM_20	Ausente	$>1,5*10^4$	$>1,5*10^4$	$>3,0*10^5$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,50	0,979	47,91
<i>Média^b</i>	-	-	-	-	-	-	-	5,42	0,978	45,16
<i>s^c</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,14	0,005	4,83
LCM_1	Ausente	$2,1*10^3$	$2,8*10^5$	$6,0*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,34	0,948	45,12
LCM_2	Ausente	$2,9*10^4$	$1,1*10^6$	$5,3*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,41	0,946	43,63
LCM_3	Ausente	$3,2*10^3$	$2,6*10^5$	$1,2*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,44	0,947	44,32
LCM_4	Ausente	$2,0*10^3$	$3,5*10^6$	$1,1*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,40	0,954	48,27
LCM_5	Ausente	$8,0*10^3$	$4,9*10^5$	$1,0*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,40	0,949	52,23
LCM_6	Ausente	$1,0*10^1$	$5,1*10^2$	$9,1*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,33	0,949	51,39
LCM_7	Ausente	$1,3*10^3$	$7,6*10^4$	$9,0*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,23	0,945	46,96
LCM_8	Ausente	$2,0*10^4$	$7,8*10^5$	$1,0*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,19	0,951	47,63
LCM_9	Ausente	$1,9*10^4$	$6,1*10^6$	$8,7*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,24	0,946	45,33
LCM_10	Ausente	$8,0*10^3$	$5,1*10^2$	$5,2*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,29	0,953	45,64
LCM_11	Ausente	$1,0*10^1$	$7,8*10^5$	$9,1*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,16	0,948	47,52
LCM_12	Ausente	$1,3*10^3$	$6,1*10^6$	$9,7*10^7$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,30	0,946	48,72
LCM_13	Ausente	$2,0*10^4$	$4,9*10^5$	$1,1*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,33	0,947	49,77
LCM_14	Ausente	$1,9*10^4$	$5,1*10^2$	$8,9*10^8$	$<1,0*10^1$	$<1,0*10^1$	Ausente	5,43	0,954	49,68

LCM_15	Ausente	1,3*10 ³	7,6*10 ⁴	1,4*10 ⁸	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,44	0,949	40,72
LCM_16	Ausente	2,0*10 ⁴	7,8*10 ⁵	9,1*10 ⁷	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,40	0,949	41,90
LCM_17	Ausente	1,9*10 ⁴	6,1*10 ⁶	9,4*10 ⁷	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,47	0,945	40,12
LCM_18	Ausente	8,0*10 ³	6,3*10 ⁶	1,3*10 ⁸	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,34	0,951	48,14
LCM_19	Ausente	1,0*10 ¹	4,9*10 ⁵	8,7*10 ⁸	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,47	0,946	49,60
LCM_20	Ausente	2,0*10 ⁴	5,1*10 ⁵	7,4*10 ⁸	<1,0*10 ¹	<1,0*10 ¹	Ausente	5,29	0,953	46,96
<i>Média^c</i>	-	-	-	-	-	-	-	5,35	0,949	46,67
<i>s^c</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,003	3,43
<i>SE^d</i>	-	-	-	-	-	-	-	NS	p<0,05	p<0,05

^a Designações para as amostras, LSM refere-se à ausência do produto e o número seguinte à série e LCM refere-se à presença do produto com o número de série em seguida

^{b,c} Os valores da média e do desvio padrão foram calculados com base nos resultados obtidos para a totalidade das amostras, em cada grupo;

^d p>0,05, estatisticamente não significativo, para a análise estatística t-student, num intervalo de confiança de 95.

Assim, verificam-se sinais da sua atividade, pelo menos, relacionados com a manutenção do aprisionamento da água, seria, portanto, crucial a determinação da durabilidade da atividade do *Mega Sense* na carne e a sua capacidade de permanecer ativo durante todo o processamento da carne, ou parte deste.

5.6. Efeito da integração do *Mega Sense* na dieta sobre o ambiente oxidativo

Para avaliação do grau de oxidação presente nas amostras de carne, obtidas a partir de animais sujeitos a uma dieta com e sem *Mega Sense*, utilizou-se o ensaio TBARS (*substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*) que tem como fundamento a determinação espectrofotométrica das espécies capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, espécies essas que resultam essencialmente do processo de peroxidação lipídica. O TBARS quantifica a presença de malondialdeído no músculo, porém esta determinação é presuntiva, já que a origem do malondialdeído não é exclusiva do processo de oxidação lipídica, nomeadamente, em consequência da quebra dos hidroperóxidos resultantes da fase de propagação, nem este composto é o único que deriva deste processo oxidativo.¹³⁵ No entanto, esta metodologia permite-nos abrir uma pequena janela sobre a ocorrência do processo peroxidativo e do seu possível impacto no músculo do animal. A quantificação do malondialdeído é realizada a partir da sua complexação com o ácido tiobarbitúrico, originando um complexo rosa (Figura 15), que a um comprimento de onda de 530 nm, apresenta uma absorvância que varia proporcionalmente à quantidade de malondialdeído presente.



Figura 15 - Avaliação da incidência da peroxidação lipídica no músculo longissimus de carne de porca, através do método TBARS. – Esta determinação é feita com base na formação de um complexo rosa que resulta da reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído presente na amostra, cuja absorvância pode ser determinada a 530 nm.

A determinação da oxidação foi realizada para as amostras refrigeradas, congeladas, com vários tempos de congelação, cozinhadas e para os lombos curados, existindo para gama de amostra sempre um grupo controlo onde não existiu a administração de *Mega Sense* na dieta do animal e um grupo de estudo onde existiu a inclusão do produto na ração animal. Na tabela 5 encontram-se detalhados os valores obtidos para a concentração de malondialdeído (*mg de malondialdeído/ kg de amostra*) para cada um dos grupos de cada gama de amostras, discriminados anteriormente. Relativamente ao processo de congelação, na tabela 6, encontram-se presentes os valores correspondentes a uma semana de execução do mesmo. Como é possível verificar, para as carnes obtidas de animais alimentados com *Mega Sense*, independentemente da gama de amostra, os valores para a concentração de malondialdeído são sempre inferiores aos obtidos na ausência do produto, e para todos os grupos de amostras a diferença verificou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Para as amostras refrigeradas, cujas análises se iniciaram 24 horas após o abate, os valores da concentração de malondialdeído obtidos foram muito baixos, praticamente nulos (as amostras apresentaram valores de absorvância da mesma ordem de grandeza que o branco). Todavia, estes valores não significam a inexistência deste composto, uma vez que, este pode ocorrer em concentrações tão baixas que não sejam abrangidas pelo limite de deteção do aparelho. Para esta gama de amostra não são possíveis conclusões sustentadas relativamente à ação do *Mega Sense*, já que, quer para as amostras obtidas de animais alimentados com o produto, quer para amostras onde esta suplementação não ocorreu, os valores são muito baixos ou nulos, impossibilitando, qualquer comparação. Contudo, o processo oxidativo, nomeadamente a peroxidação lipídica, apesar dos resultados obtidos, não deixou de ocorrer, porém esta cadeia reacional poderá não ter ocorrido com impacto suficiente, no espaço de 24 horas, capazes de originar malondialdeído em concentrações passíveis de serem determinadas, algo que poderia ter acontecido, se o método aplicado fosse mais sensível para pequenas concentrações.¹¹⁹ Todavia, é importante ter presente que existe a possibilidade de o processo de extração, associado à primeira etapa do trabalho, ter sido deficiente, o que poderia ter como consequência os resultados obtidos.

A análise da tabela 6, cuja a continuação para o lombo curado surge no anexo 2, permite verificar numa primeira instância que, os valores obtidos, por parte das amostras cozinhadas, para a concentração de malondialdeído são altamente elevados quando comparados com as restantes gamas de amostras. Este acontecimento deve-se ao facto de

as amostras cozinhadas terem sido submetidas a um processo de cozedura, que implicou que estivessem sobre temperaturas elevadas, $110^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante aproximadamente 35 minutos, processo este, que implicou várias alterações estruturais e químicas na peça de carne, que influenciaram diretamente as taxas oxidativas e o grau e impacto com que aconteceram. Assim, para as amostras, cujos animais ingeriram *Mega Sense*, submetidas ao processo de cozedura a concentração de malondialdeído foi: $17,9\pm 0,1$ (mg de malondialdeído/ kg de amostra) já a concentração obtida para o grupo controlo foi de: $22,5\pm 0,1$ (mg de malondialdeído/ kg de amostra), a aplicação da análise estatística t-student resulta em $p < 0,05$, ou seja, a diferença entre os valores obtidos é estatisticamente positiva. Através da comparação destes valores depreende-se que o ambiente oxidativo para as amostras, oriundas de uma alimentação suplementada com produto, é menor, pelo menos, a concentração de malondialdeído é inferior e, portanto, pode deduzir-se que a peroxidação lipídica apesar de ocorrer não é tão severa. O resultado de uma taxa oxidativa menor pode advir da ação antioxidante a que o *Mega Sense* se propõe, já que, os dois grupos de amostras foram manipulados de forma semelhante desde do abate até ao momento de análise, inclusive, destacando-se como a única diferente significativa a presença do produto.¹³⁶ Assim, pode assumir-se uma ação do produto, que para esta gama de amostras se revelou bastante eficaz, tendo ocorrido o processo de cozedura para baixas taxas oxidativas, e, portanto, alterações desejadas na carne, nomeadamente a nível organolético. De uma carne cozida espera-se a cor castanha, não muito demarcada, mas suficiente para demonstrar ao consumidor que, visualmente, a sua carne se encontra devidamente cozinhada.¹³⁷ Comparando os valores obtidos para a concentração de malondialdeído com o parâmetro a^* determinado na análise da cor, verifica-se uma concordância de resultados. Uma vez que, para as amostras, cuja a alimentação animal inclui o produto, os valores de a^* são superiores e os da concentração de malondialdeído são inferiores, com significância estatística, relativamente aos valores obtidos a partir de amostras da mesma gama, porém oriundas de uma alimentação animal não suplementada.¹³⁸

Tabela 6 – Determinação da concentração de malondialdeído (mg de malondialdeído/ 1000 g de amostra) paras as diferentes amostras na presença e ausência do *Mega Sense*, para um intervalo de 95% de confiança.

	<i>Carne refrigerada</i>	<i>Carne congelada</i>	<i>Carne cozinhada</i>	<i>Lombo Curado^a</i>
	<i>[malondialdeído]</i> (mg de malondialdeído/ kg de amostra)	<i>[malondialdeído]</i> (mg de malondialdeído/ kg de amostra)	<i>[malondialdeído]</i> (mg de malondialdeído/ kg de amostra)	<i>[malondialdeído]</i> (mg de malondialdeído/ kg de amostra)
SM_1 ^d	0	8,42x10 ⁻³	22,8	1,72
SM_2	SR	0,033	21,32	1,72
SM_3	SR	0,014	22,54	1,74
SM_4	SR	0,056	23,12	1,72
Média^b	---	0,028	22,5	1,85
<i>s^b</i>	---	0,02	0,8	0,13
CM_1			18,25	1,02
CM_2	SR	VN ^d	18,01	0,77
CM_3	SR	VN	17,79	1,22
CM_4	SR	VN	17,48	0,90
Média^b	SR	VN	17,9	0,8591
<i>s^b</i>	SR	VN	0,3	0,1240
<i>SE^c</i>	SR	p<0,05	p<0,05	p<0,05

^a – O ensaio TBARS foi realizado para 20 amostras em cada um dos grupos em análise (presença e ausência de *Mega Sense*), na tabela surgem apenas os primeiros quatro valores obtidos;

^b – Os valores da média e do desvio padrão foram calculados com base nos resultados obtidos para a totalidade das amostras, em cada grupo;

^c – SE – significância estatística; p<0,05, estatisticamente significativo, para a análise estatística t-Student, num intervalo de confiança de 95%.

^d – VN – valor nulo

Assim, a conjugação dos valores obtidos para as quantidades de malondialdeído presentes nos dois grupos de amostras com a* permite concluir que, realmente existiu um impacto positivo e significativo na presença do *Mega Sense*, relativamente à sua capacidade para diminuir o ambiente oxidativo, esta que pode exercer efeito antes do processo de cozedura, durante e no final, caso a ação do produto se mantenha, mesmo a altas temperaturas.¹³⁷ Deste modo, espera-se uma carne com mais qualidade, já que a extensão das reações oxidativas não será tão forte e processos como a desnaturação proteica não aconteceram de foram tão austera. A carne poderá assim, adquirir características organoléticas desejadas como a tenrura, que resulta do processo de tenderização, que é mais estimulado pela temperatura, o aroma, cor e sabor como vimos anteriormente.⁴⁷

Como o processo de congelação visa sobretudo a conservação da amostra, a avaliação oxidativa das amostras foi realizada para o tempo inicial t0, considerando os valores obtidos para as amostras refrigeradas, presentes na tabela 16, para carnes após uma semana de congelação (t2), um mês (t3), e dois meses de congelação (t4).

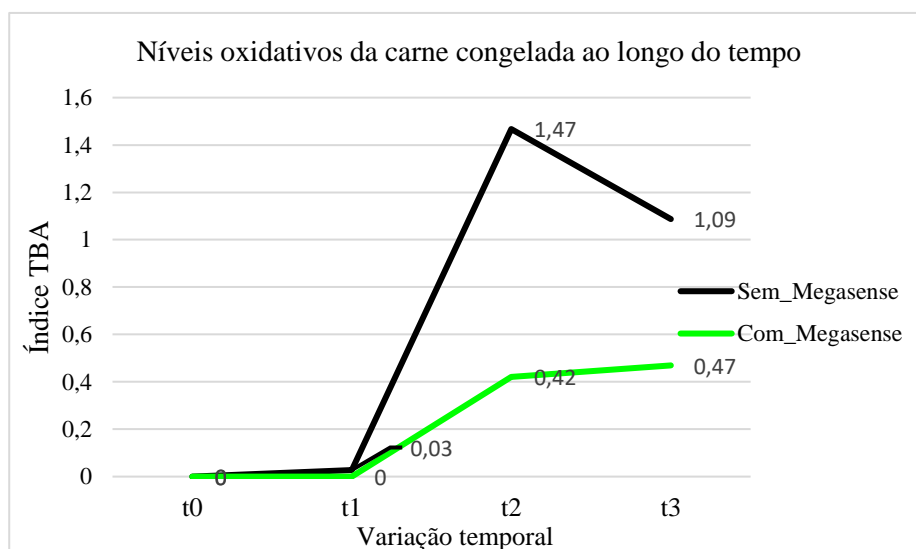


Figura 16 – Variação do ambiente oxidativo ao longo do tempo. A avaliação oxidativa das amostras foi realizada em t0, considerando os valores obtidos para as amostras refrigeradas, t2, uma semana, t3, um mês e t4, dois meses de congelação, figura 17, e em todas análises a gama com Mega Sense demonstrou valores oxidativos menores, estatisticamente significativos, $p < 0,05$.

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos para os níveis de malondialdeído das amostras congeladas, para diferentes tempos de congelação. Pode observar-se para toda a faixa temporal analisada que a presença de *Mega Sense* na dieta do animal origina valores oxidativos menores, estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Este

comportamento oxidativo reduzido é, do mesmo modo que para as amostras cozinhadas, suportado pelos valores de a^* , concluindo-se que durante o processo de congelação/descongelação o *Mega Sense* pode revelar-se bastante vantajoso. A ação deste suplemento antioxidante nas amostras congeladas, principalmente para tempos alargados de congelação, é de grande interesse por parte de empresas retalhistas que direcionam as suas atenções para a manufatura de transformados, isto porque, o produto revela uma atividade antioxidante que se mantém até dois meses de congelação, e, quiçá, mais tempo.¹²⁴ Ao analisarmos os valores obtidos para o lombo que resulta de um processo de cura, onde por si só, são esperadas elevadas taxas oxidativas, resultado por exemplo, da adição de sal e outros aditivos na sua manufatura, verificamos uma tendência positiva na presença do produto. Ou seja, na presença do *Mega Sense*, fruto da suplementação alimentar do animal, verifica-se uma tendência para os níveis oxidativos serem mais baixos, o que revela uma permanência da ação antioxidante, mesmo durante todo o processamento da carne. Com base nas análises realizadas, e dado o controlo oxidativo, prevê-se uma longa duração na função do produto, a nível oxidativo, sendo, portanto, muito vantajosa a sua introdução na dieta do animal.¹³⁹ Não obstante os resultados obtidos, é importante perceber que esta ação potencialmente duradoura do produto, pode, assim como na carne cozinhada, resultar da sua atividade inicial que promove baixa taxa oxidativa, pois não foi controlado, em momento algum, o grau de oxidação a que a carne estava submetida, apenas foi feita uma medição grosseira da quantidade de malondialdeído que nos permite assumir empiricamente as possíveis variações oxidativas que possam ter ocorrido. Estes resultados, contudo, revelam-se contraditórios com os obtidos para o estudo do efeito do produto em parâmetros qualitativos como a atividade da água e humidade, em produtos transformados, nomeadamente, o lombo curado. Assim, é possível concluir que esta ação antioxidante não abrange a proteção indireta de alguns parâmetros ao longo de todo o processo de transformação.¹⁴⁰

Diversos estudos corroboram a eficácia do *Mega Sense* contra a oxidação. Por exemplo, Buckley et al (1989)¹⁴¹ reportou pela primeira vez os efeitos de suplementação da dieta de porcos com α -tocoferol. Com a avaliação da oxidação, via TBARS, e da estabilidade da membrana celular, esta equipa verificou que quanto maiores as quantidades de α -tocoferol, maior estabilidade se espera no ambiente celular¹⁴². Em suma, a presença do *Mega Sense* na dieta do animal, pode realmente ser significado de uma qualidade da carne melhorada, dado o seu impacto no processo oxidativo.

5.7. Efeito da suplementação do *Mega Sense* na dieta sobre o perfil lipídico

A carne de porco apresenta um perfil lipídico composto essencialmente por ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico, composição que se mantém semelhante em produtos transformados.¹⁴³ Com recurso à análise cromatográfica gasosa acoplada com detetor por ionização de chama foi possível determinar o perfil lipídico de cada amostra. Assim deste modo, na figura 17 encontram dois cromatogramas a título de exemplo, LSM_18¹ e LCM_18², respetivamente, que ilustram todos os cromatogramas obtidos. Em anexo, (anexo 3) surgem os restantes cromatogramas obtidos para as amostras de lombo curado provenientes de uma dieta não suplementada e, que, permitem observar a verosimilhança entre cromatogramas de diferentes amostras. Contudo, deve estar presente que entre cromatogramas existem pequenas diferenças relativamente à área dos picos e ligeiras variações relativamente ao tempo de retenção. A partir do valor das áreas obtidas em cada um dos cromatogramas, de todas as amostras obtidas, foi efetuada a avaliação presuntiva do impacto oxidativo nos ácidos gordos relativamente, à presença e/ou ausência de insaturações e de determinados ácidos gordos que são cruciais para a qualidade da carne, quer organolética quer nutricional.

Mediante a informação presente na monografia face ao efeito da oxidação sobre os ácidos gordos e a sua propensão para sofrerem ação destrutiva de ROS, sabe-se que esta aumenta com a presença de insaturações.¹¹⁹ Na figura 18, são apresentados os gráficos da razão AG saturados/insaturados, para cada uma das gamas de amostras, oriundas de dietas onde ocorreu suplementação com *Mega Sense* e onde esta ação não teve lugar. Quanto menor esta razão maior a quantidade de AG mono- e polinsaturados em relação aos AG saturados, variação esta, que é pretendida com a introdução do *Mega Sense* na dieta do animal. Para a determinação desta razão, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C17:0) compuseram o grupo dos saturados, já os ácidos oleico (C18:1) linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) integraram o grupo do insaturados. Este último ácido gordo não integra, tipicamente, os cálculos para a determinação desta razão, uma vez que, a presença deste ómega-3 é reduzida na carne de porco e, face ao ambiente oxidativo a que a carne pode estar sujeita, a sua concentração é muitas vezes vestigial.

¹ LSM – Lombo Curado oriundo de uma dieta sem suplementação com *Mega Sense*

² LCM - Lombo Curado oriundo de uma dieta com suplementação de *Mega Sense*

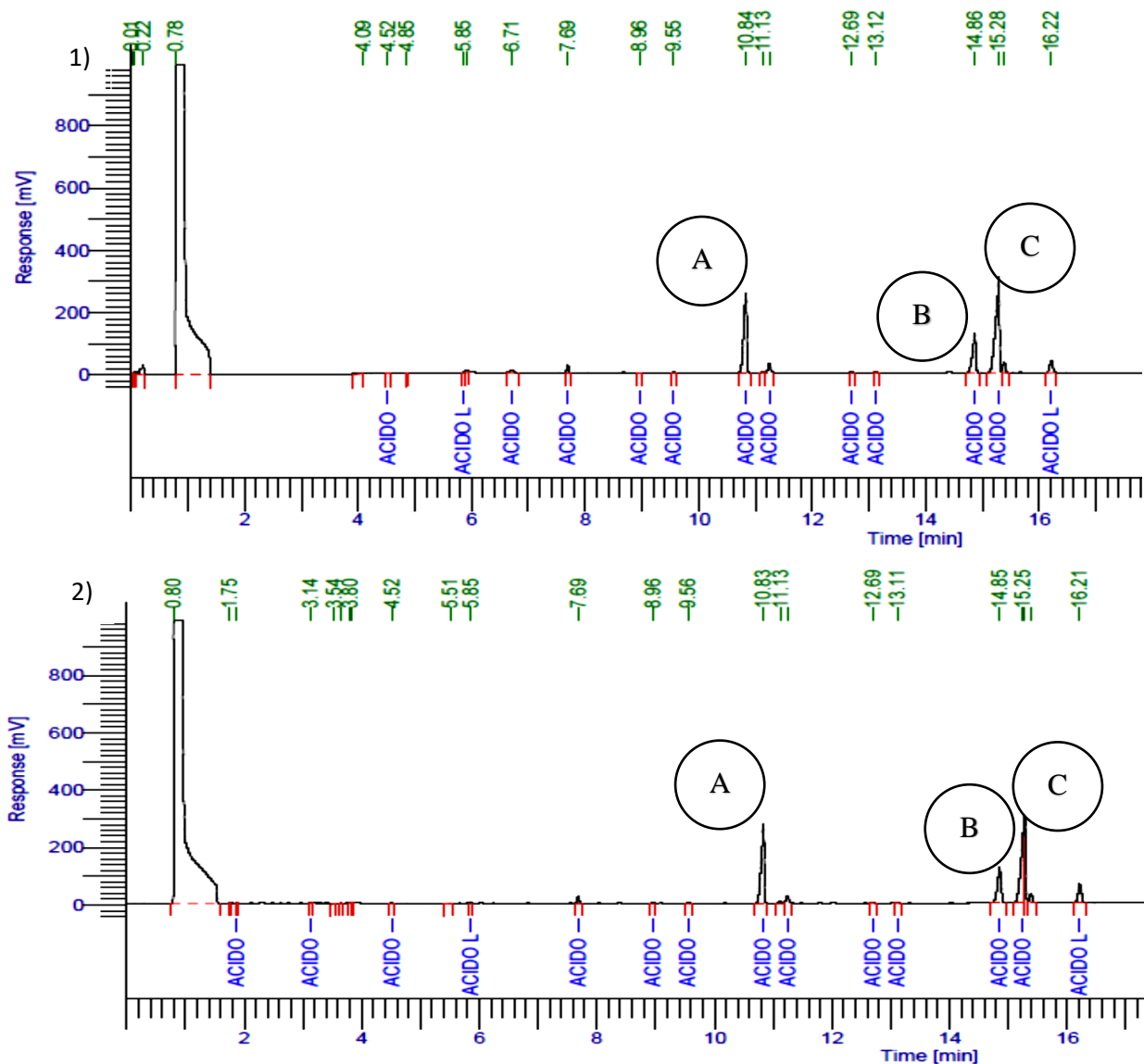


Figura 17 - Cromatogramas obtidos na análise do perfil lipídico para amostras de lombo curado. O perfil lipídico é semelhante em para todas as amostras, assim, os cromatogramas acima apresentados surgem como exemplo dos cromatogramas obtidos. A figura 19 (1) corresponde a amostras resultantes de dietas não suplementadas e a figura 19 (2) a amostras resultantes de dietas suplementadas.

A análise da figura 18, permite visualizar que apenas para o lombo curado existe uma relação saturados-insaturados favorável, para o grupo obtido a partir da suplementação da dieta com *Mega Sense*. O aumento das duplas ligações nos ácidos gordos deveria ser sustentado pela existência do *Mega Sense* na carne porque, conforme aquilo que foi averiguado na secção relativa à avaliação da oxidação, onde o produto exerce um impacto ativo e benéfico contra o desenvolvimento do ambiente oxidativo, promovendo assim, a homeostasia do mesmo.

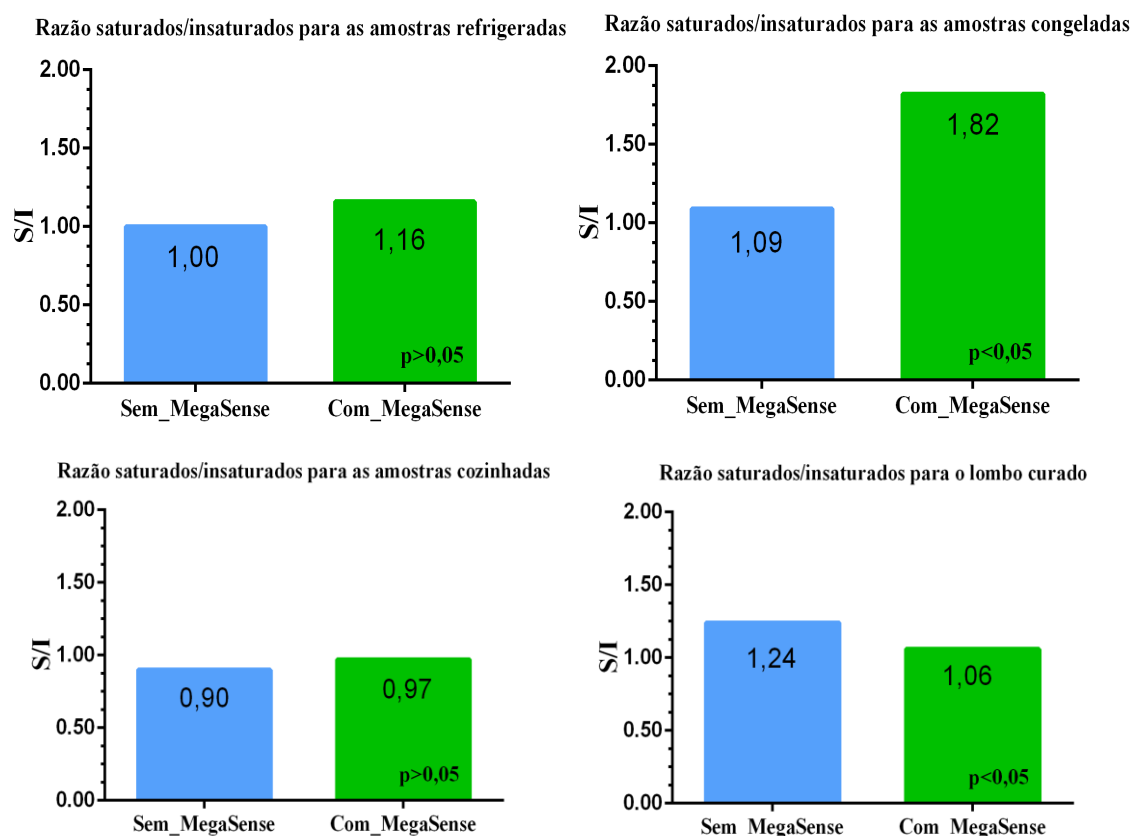


Figura 18 -Análise comparativa da razão de saturados/insaturados. Os ácidos gordos palmítico e esteárico compuseram o grupo dos saturados e os ácidos oleico, linoleico e algumas vezes o linolénico, compuseram o grupo dos insaturados. Quanto maior for a razão, maior é a prevalência de saturações, porém, o indicado, sobretudo para a saúde é a prevalência de insaturações, preferencialmente de várias. A comparação estatística dos resultados foi realizada com base na análise t-student para um intervalo de 95%, verificando-se que apenas para as amostras de lombo curado existem insaturações em maior quantidade, do ponto de vista da significância estatística.

Porém, tal não se verifica, para todas as amostras de carne não transformada a razão saturados/insaturados é superior na presença de dietas suplementadas. Apesar de não ser um comportamento estatisticamente significativo, com a exceção das amostras congeladas, onde existe significância, verifica-se uma ligeira tendência para a razão saturados/insaturados ser superior para amostras que apresentam *Mega Sense* na dieta. Assim, ainda que de forma especulativa, é possível afirmar que a capacidade antioxidante deste aditivo alimentar poderá não exercer qualquer papel a nível da peroxidação lipídica, como anteriormente foi inferido.¹⁴² No entanto, este tipo de informações só será sustentada com um estudo detalhado do efeito do produto sobre este acontecimento oxidativo. O lombo curado surge valores que contrastam com os obtidos para as restantes amostras, acontecimento este, que pode ter origem em todo o processamento ao qual é submetido, já que as amostras do grupo controlo podem ter sido submetidas a mais

concentrações de sal e/ou açúcares durante o processo de transformação resultando numa maior taxa degradativa dos lípidos, consequência da diminuição de pH, o que resulta numa menor quantidade de insaturados no produto final.¹⁴⁴

O ácido linoleico, que é um ómega-6, é bastante abundante na carne, surgindo normalmente, em elevadas quantidades. Na figura 19 encontram-se discriminadas as percentagens deste ómega nas amostras estudadas. Nos grupos das amostras não

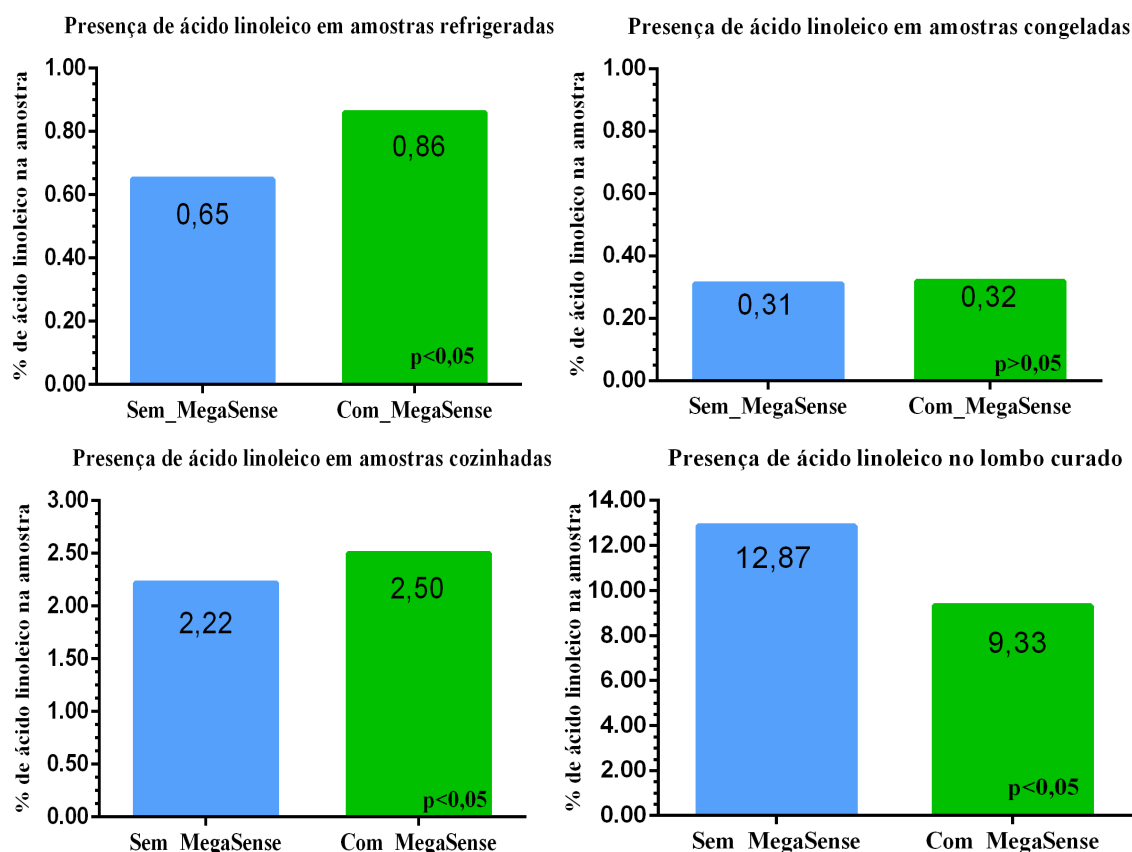


Figura 19 - Quantidade de ácido linoleico em todas as gamas de amostras. As percentagens de ácido linoleico apresentadas representam a média obtida para cada grupo de amostras, provenientes de dietas com e sem o Mega Sense, tendencialmente o linoleico surge em quantidades superiores na presença do produto, com exceção das amostras de lombo curado, onde a quantidade de linoleico é inferior na presença do produto, para um $p<0,05$.

transformadas, cuja alimentação animal inclui o *Mega Sense*, existe uma tendência positiva para os valores de correspondentes a este ácido serem superiores, às obtidas para o grupo controlo de todas as gamas.

As amostras refrigeradas apresentam valores de $0,65\% \pm 0,01\%$ e $0,87\% \pm 0,01\%$, para os grupos controlo e resultantes da suplementação, respetivamente, esta diferença é significativa estatisticamente, $p<0,05$, assim como para as amostras cozinhadas (SM¹:

2,22%±0,01% e CM²: 2,50%±0,01%). Já as amostras congeladas (SM²: 0,31%±0,01% e CM³: 0,32%±0,01%) não se verifica significância estatística, porém, existe apenas uma tendência positiva para os valores de linoleico serem superiores nos grupos referentes à dieta aditivada. Os resultados obtidos para a percentagem de ácido linoleico não suportam as conclusões retiradas para a avaliação da razão de ácidos gordos saturados/insaturados. Todavia, é importante ter presente que, esta razão não espelha o real impacto do produto no perfil, permite-nos sim, fazer uma primeira análise genérica daquela que será a sua tendência. Isto porque, a razão engloba ácidos gordos que naturalmente se encontram em quantidades superiores a outros na carne de porco, por exemplo, o ácido palmítico surge sempre em quantidades muito superiores ao ácido linoleico, o que por si só, fará com que os valores da razão calculada sejam elevados. Este cálculo, permite no entanto, perceber se a proporção saturados:insaturados se encontra muito díspar, facto que se verifica para todas as amostras não processadas provenientes da suplementação quando em comparação com o seu controlo. Não obstante, com a análise deste ácido verifica-se uma possível ação positiva por parte do *Mega Sense*, já que parece haver a propensão para que, na presença do produto, haja maior quantidade de C18:2. A atividade antioxidante poderá ser responsável por esta manutenção da quantidade de ácido linoleico na carne de porco estudada, porém, esta manutenção do ambiente oxidativo controlado, parece exibir também uma proteção sobre os ácidos gordos saturados, facto que poderá culminar com o aumento da razão saturados/insaturados para as amostras suplementadas não transformadas.¹⁴⁵

Relativamente ao ácido linolénico, a sua presença foi também determinada, contudo, nas amostras resultantes do grupo controlado a sua presença não foi detetada por GC-FID, como é possível verificar através da análise da tabela 7.

Tabela 7 – Comparação da quantidade de ácido linolénico para todos os grupos de amostras, na presença e ausência de *Mega sense*, para um intervalo de confiança de 95% na análise *t-student*.

<i>Amostras</i>	% ácido linolénico na amostra ^a		<i>p</i>
	<i>“Sem”_ Mega Sense</i>	<i>“Com”_ Mega Sense</i>	
Refrigeradas	-	0,117	p<0,05 ^b
Congeladas	-	0,018	p<0,05

² SM: Sem *Mega Sense*

³ CM: Com *Mega Sense*

Cozinhadas	-	-	-
Lombo curado	-	0,569	p<0,05

^a –A percentagem de ácido linolénico apresentada representa a média ($\pm 0,001$) obtida para todas as amostras analisadas;

^b - p>0,05, estatisticamente não significativo, para a análise estatística t-student, num intervalo de confiança de 95%.

Com a análise desta tabela é possível averiguar que a percentagem de ácido linolénico, nas amostras resultantes da suplementação com *Mega Sense*, ainda que em valores baixíssimos, é maior do que a obtida para as amostras controlo. A inclusão do *Mega Sense* na dieta do animal, de entre muitos objetivos, destaca a proteção dos ácidos gordos insaturados contra processos de degradação oxidativa, fazendo com que a sua quantidade inicial tenda a permanecer no músculo, porém esta ação não é específica, já que, também parece existir a proteção de ácidos gordos saturados.

No presente trabalho, foi dado especial destaque aos ácidos linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) pois, para a carne de porco o ácido linoleico é o polinsaturado mais comum e o ácido linolénico é aquele, cuja concentração se pretende aumentar. Através destes é possível determinar as percentagens da razão ω -3/ ω -6, que se revela benéfica para a saúde, quando é superior a 2, revelando maior quantidades de ácido linolénico.¹⁴⁰ Adicionalmente, é possível relacionar os resultados obtidos para o perfil lipídico com as conclusões retiradas para a humidade e atividade da água, já que, para uma dieta aditivada se verificou que, as percentagens de humidade menores, comportamento que pode ser explicado devido à menor taxa oxidativa que afeta a membrana, esta que é essencialmente constituída por ácidos gordos polinsaturados e, que, provoca o processo de exsudação. Com a proteção do perfil, prevê-se uma possível proteção da membrana e, conseqüentemente, uma melhoria na qualidade da carne relativamente a estes parâmetros e um possível aumento do tempo de prateleira. Contudo, a ação do produto é incompleta quando o foco é a avaliação da razão saturados/insaturados, pois, com uma proteção dos ácidos gordos ao ambiente oxidativo, a razão tenderá a ser sempre elevada. Já que, apesar dos ácidos insaturados apresentarem maior propensão oxidativa, os ácidos saturados também são atacados por ROS e sofrem degradação. Assim, a ação do *Mega Sense* poderá ser reforçada, com a adição de ómeegas-3 à dieta do animal que já é suplementada com o produto, esta ação irá contrariar a tendência verificada na figura 18 e melhorar portanto, a qualidade final da carne.¹⁴⁶

5.8. Validação preliminar com vista à acreditação do método de ensaio aplicado para a determinação de ácidos gordos em matrizes alimentares variadas

5.8.1. Caracterização do cromatograma do FAME Mix utilizado como padrão de identificação para as análises cromatográficas

O processo de validação e acreditação de análise de FAMES via GC-FID deve iniciar-se pela caracterização de um cromatograma padrão cuja utilização, com base nos tempos de retenção, permite a identificação dos picos obtidos para cada amostra em análise. Assim, com base no procedimento descrito em § 4.8, foi analisada a mistura certificada (ISO Guide 34:2009 e ISO/IEC 17025:2005) de ésteres de metilo de ácidos gordos (*Supelco 37 Component FAME mix*, Sigma-Aldrich), de concentrações conhecidas em diclorometano, que serviu como padrão para identificação dos ésteres de metilo obtidos nas amostras em análise. Na figura 20 apresenta-se a identificação de cada um dos picos, mediante a sua estrutura e tempo de retenção característicos, permitindo a sua correta determinação, a concentração do mix padrão injetada foi de 0,02 µg/µL, porém, é

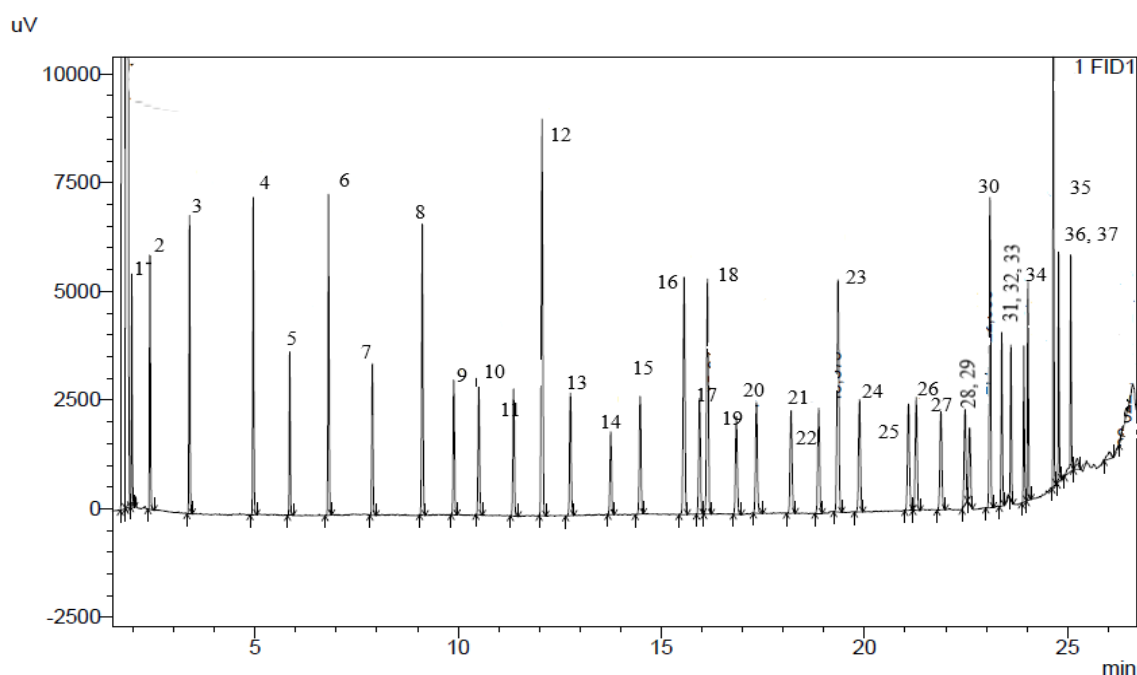


Figura 20 – Identificação dos picos obtidos para o mix padrão com 37 ácidos gordos, numa concentração de 0,02 µg/µL. (1 – C4:0; 2- C6:0; 3 – C8:0; 4 – C10:0; 5 – C11:0; 6 – C12:0; 7 – C13:0; 8 – C14:0; 9 – C14:1 cis-9; 10 – C15:0; 11 – C15:1 cis-10; 12 – C16:0; 13 – C16:1 cis-9; 14 – C17:0; 15 – C17:1 cis-10; 16 – C18:0; 17 – C18:1 trans-9; 18 – C18:1 cis-9; 19 – C18:2 trans-9,12; 20 – C18:2 cis-9,12; 21 – C18:3 cis-6,9,12; 22 – C20:0; 23 – C18:3 cis-9,12,15; 24 – C20:1 cis-11; 25 – C21:0; 26 – C20:2 cis-11,14; 27 – C22:0; 28 – C20:3 cis-8,11,14; 29 – C20:3 cis-11,14,17; 30 – C22:1 cis-13; 31 – C20:4 cis-5,8,11,14; 32 – C23:0; 33 – C22:2 cis-13,16; 34 – C20:5 cis-5,8,11,14,17; 35 – C24:0; 36 – C24:1 cis-15; 37 – C22:6 cis-4,7,10,13,16,19.

importante ter presente que, os diferentes ésteres de metilo presente nesta mistura se encontram em diferentes concentrações, como surge em seguida.

Na tabela 8 apresenta-se a identificação dos picos obtidos no cromatograma, mediante a sua posição no cromatograma, cadeia carbonada e respetivo tempo de retenção, permitindo um correto cruzamento de dados e, conseqüentemente, uma identificação adequada dos picos obtidos, futuramente, nos cromatogramas para as diversas matrizes que são submetidas a análise

Tabela 8 – Ácidos gordos correspondentes aos ésteres metílicos dos AGs presentes no FAME Mix analisado, com discriminação da cadeia carbonada, nomenclatura e tempo de retenção (minutos) respetivos.

	Cadeia carbonada	Nomenclatura sistemática	Tempo de retenção (minutos)
1	C4:0	Butírico	1,970
2	C6:0	Capróico	2,418
3	C8:0	Caprílico	3,391
4	C10:0	Cáprico	4,960
5	C11:0	Undecanóico	5,859
6	C12:0	Láurico	6,814
7	C13:0	Tridecanóico	7,895
8	C14:0	Mirístico	9,124
9	C14:1 cis-9	Miristoleico	9,902
10	C15:0	Pentadecanóico	10,517
11	C15:1 cis-10	cis-10- Pentadecenóico	11,374
12	C16:0	Palmítico	12,072
13	C16:1 cis-9	Palmitoleico	12,771
14	C17:0	Margárico	13,767
15	C17:1 cis-10	Margaroleico	14,492
16	C18:0	Estearico	15,567
17	C18:1 trans-9	Elaídico	15,952
18	C18:1 cis-9	Oleico	16,146
19	C18:2 trans-9,12	Linolelaídico	16,862
20	C18:2 cis-9,12	Linoleico	17,353
21	C18:3 cis-6,9,12	gama-Linolénico	18,206
22	C20:0	Araquídico	18,886
23	C18:3 cis-9,12,15	Linolénico	19,358
24	C20:1 cis-11	Gadoleico	19,892
25	C21:0	Heneicosanoico	21,098
26	C20:2 cis-11,14	cis-11,14-Eicosadienóico	21,285
27	C22:0	Beénico	21,894
28	C20:3 cis-8,11,14	cis-8,11,14-Eicosatrienóico	22,491
29	C20:3 cis-11,14,17	cis-11,14,17-Eicosatrienóico	22,604
30	C22:1 cis-13	Erúcido	23,095
31	C20:4 cis-5,8,11,14	Araquidónico	23,385
32	C23:0	Tricosanoico	23,611

33	C22:2 cis-13,16	cis-13-16-Docosadienóico	23,930
34	C20:5 cis-5,8,11,14,15	EPA	24,028
35	C24:0	Linhocérico	24,652
36	C24:1 cis-15	Nervónico	24,782
37	C22:6 cis-4,7,10,13,16,19	DHA	25,710

Posto isto, torna-se importante iniciar o processo de validação partindo pela quantificação que, como abordado anteriormente, engloba as curvas de calibração, limites analíticos e a sensibilidade relativamente à metodologia de análise.

5.8.2. Quantificação

5.8.2.1. Curvas de calibração e avaliação da linearidade

Devem estabelecer-se curvas de calibração para cada um dos 37 ácidos que se pretendem analisar, nas mais diversas matrizes alimentares. Assim, e tendo em conta que, na mistura padrão utilizada os ésteres de metilo dos ácidos gordos se encontram em diferentes concentrações 200 µg/mL, 400 µg/mL e 600 µg/mL foram estabelecidas 5 concentrações, cujos fatores de diluição foram: $\frac{1}{20}$; $\frac{1}{15}$; $\frac{1}{10}$; $\frac{1}{5}$ e 1 para estabelecimento da curva de calibração para cada um dos ácidos. Em paralelo com esta determinação e em conjugação com a avaliação dos coeficientes de correlação e de determinação, r e r^2 , respetivamente, foram aplicados os testes de Rikilt e Mandel que nos permitem uma avaliação assertiva relativamente à linearidade, pois, os coeficientes, sobretudo o de correlação, é um bom indicador da correlação entre os pontos das retas de calibração para cada dos ácidos gordos, o que nem sempre poderá significar linearidade.¹¹⁰ Posto isto, na tabela 9 são apresentadas as retas de calibração obtidas para cada um dos ácidos gordos, os coeficientes de correlação e determinação e ainda os resultados qualitativos obtidos após aplicação dos testes de verificação estatística.

Tabela 9 – Equação da reta de calibração obtida para cada um dos ácidos gordos assim como, os r e r^2 e ainda o teste de Rikilt.

	Ácido gordo	Equação ($y=ax+b$)	r	r^2	Teste de Rikilt
1	Butírico	$y=1,91*10^8-10,0*10^8$	0,994	0,99	Linear
2	Capróico	$y=3,1*10^4-2,6*10^3$	1,00	1,00	Linear
3	Caprílico	$y=3,6*10^4-2,5*10^3$	1,00	1,00	Linear
4	Cáprico	$y=3,9*10^4-2,4*10^3$	1,00	1,00	Linear
5	Undecanóico	$y=1,9*10^4-1,0*10^3$	1,00	1,00	Linear
6	Láurico	$y=4,1*10^4-1,9*10^3$	1,00	1,00	Linear

7	Tridecanóico	$y=2,0*10^4-6,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
8	Mirístico	$y=4,2*10^4-1,0*10^3$	1,00	1,00	Linear
9	Miristoleico	$y=2,0*10^4-4,9*10^3$	1,00	1,00	Linear
10	Pentadecanóico	$y=2,1*10^4-2,0*10^2$	1,00	1,00	Linear
11	cis-10- Pentadecenóico	$y=2,1*10^4-1,7*10^2$	1,00	1,00	Linear
12	Palmítico	$y=6,5*10^4-2,4*10^2$	1,00	1,00	Linear
13	Palmitoleico	$y=2,1*10^4-2,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
14	Margárico	$y=1,4*10^4-1,0*10^2$	1,00	1,00	Linear
15	Margaroleico	$y=2,1*10^4-1,1*10^2$	1,00	1,00	Linear
16	Esteárico	$y=4,3*10^4-5,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
17	Elaídico	$y=2,1*10^4-2,5*10^2$	1,00	1,00	Linear
18	Oleico	$y=4,4*10^4-4,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
19	Linolelaídico	$y=1,8*10^4+3,0*10^2$	1,00	1,00	Linear
20	Linoleico	$y=2,1*10^4+3,4*10^2$	1,00	1,00	Linear
21	gama-Linolénico	$y=2,1*10^4+3,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
22	Araquídico	$y=4,5*10^4+6,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
23	Linolénico	$y=2,1*10^4+3,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
24	Gadoleico	$y=2,2*10^4+4,1*10^2$	1,00	1,00	Linear
25	Heneicosanoico	$y=2,2*10^4+3,0*10^2$	1,00	1,00	Linear
26	cis-11,14-Eicosadienóico	$y=2,2*10^4+4,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
27	Beénico	$y=4,5*10^4+3,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
28	cis-8,11,14-Eicosatrienóico	$y=2,0*10^4+4,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
29	cis-11,14,17-Eicosatrienóico	-	-	-	-
30	Erúcido	$y=2,2*10^4+1,6*10^2$	1,00	1,00	Linear
31	Araquidónico	$y=2,1*10^4+1,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
32	Tricosanoóico	$y=2,1*10^4+1,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
33	cis-13-16-Docosadienóico	$y=1,7*10^4+2,2*10^2$	1,00	1,00	Linear
34	EPA	$y=1,9*10^4+2,7*10^2$	1,00	1,00	Linear
35	Linhocérico	$y=4,6*10^4-5,8*10^2$	1,00	1,00	Linear
36	Nervónico	$y=2,1*10^4-2,3*10^2$	1,00	1,00	Linear
37	DHA	$y=1,3*10^4+2,8*10^2$	1,00	1,00	Linear

As retas de calibração foram traçadas mediante as áreas dos picos obtidas para cada uma das concentrações aplicadas. Contudo apenas 3 foram utilizadas para calibração, correspondentes aos fatores de diluição 1/20; 1/15 e 1. A execução de curvas de calibração com apenas 3 pontos é aceitável, porém, torna a validação em torno destas pobre, pois testes como o Mandel, não pode ser aplicado para uma gama de trabalho tão reduzida, uma vez que são necessários mais de 4 pontos para que os cálculos a efetuar sejam possíveis.¹¹⁶ Com a análise da tabela 9, verificam-se valores de r e r² bastante próximos 1,00, comportamento que é reflexo da insuficiência de pontos que permitam a existência de qualquer variação, pois o ajuste da reta para apenas 3 pontos torna-se

facilitada e, portanto, os valores do coeficiente de correlação e determinação são elevados demonstrando um ajuste que para mais concentrações pode não se verificar.⁸⁴ Contudo, a realização de curvas com apenas 3 pontos é aceitável para a empresa, numa fase inicial, dada a elevada carga laboral e falta de tempo para conjugar mais ensaios que permitam o alargamento da gama de concentrações para cada um dos ácidos gordos. Este processo, terá, todavia, de ser realizado se o processo de calibração progredir, pois é necessária uma análise completa e robusta da linearidade. A escassez de pontos torna assim as curvas de calibração fracas, no entanto, é possível verificar uma tendência positiva para a linearidade nomeadamente através da observação dos valores obtidos para os coeficientes de correlação e determinação.¹¹⁴ Apesar da carência de pontos foi possível a aplicação do teste de Rilkit que, resumidamente enuncia o seguinte: a reta é considerada linear se $(y_i/x_i)/(y_i/x_i)_m (\%) = 100 \pm 10\%$, facto que foi comprovado para cada ponto de cada reta de calibração obtida para cada um dos ácidos gordos em estudo. Deste modo, apesar das limitações referidas, é possível inferir que todas as curvas obtidas se apresentam lineares. O estudo será continuado e melhorado futuramente, através do estabelecimento de curvas de calibração utilizando maior número de concentrações para cada padrão, permitindo o aumento da gama de trabalho, de modo a que o teste de Mandel possa ser executado e, deste modo, corroborar os resultados obtidos quer para os coeficientes quer para o teste de Rilkit.

Capítulo 6 – Conclusão e diretrizes futuras

A DIN foca a sua atividade no desenvolvimento de rações que promovam o bem-estar animal e, conseqüentemente, resultem numa carne de qualidade superior, procurando sempre inovar no campo da nutrição animal. Deste modo, surgiu o estágio que integrei e, cuja finalidade, foi avaliar o impacto que o *Mega Sense*, um suplemento alimentar, exerce sobre a carne de porco a nível qualitativo. E, assim, contribuir através da execução deste projeto, para o desenvolvimento do conhecimento da empresa sobre o produto, alcançando assim as suas potencialidades e possíveis aplicações.

O *Mega Sense* é introduzido na dieta do animal na fase final do seu crescimento, cerca de um mês antes do abate, e, integra uma pequena parte daquele que é o volume total de ração aplicado. Ao longo do presente trabalho, o comportamento ou a ação deste suplemento alimentar nem sempre foi concordante com as expectativas. Estas discrepâncias poderão ser reflexo de uma introdução tardia na dieta do animal, o que resulta numa incorporação mais baixa deste produto a nível muscular por parte do animal, ou a falta de especificidade de ação do produto, já que este apenas protege a carne contra a oxidação de uma forma muito global, não existindo especificidade de ação. Todavia, numa análise global, verifica-se um efeito positivo por parte do *Mega Sense*, nomeadamente, a nível oxidativo, com especial destaque para os resultados obtidos para a cor, determinação das espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico onde, é possível destacar o impacto que o produto provoca nas amostras em análise.

Em suma, o *Mega Sense* provoca alterações qualitativas positivas, porém, poderá reforçar este efeito se o tempo da sua inclusão na dieta do animal for aumentado, quatro meses, ou até mesmo para todo o período de vida do animal desde o desmame até ao abate, contudo, isto traz custos associados que terão de ser balanceados pelas empresas que detenham interesse no mesmo. Assim, com maior tempo de ingestão, prevê-se a incorporação em quantidades superiores do produto, e, portanto, uma maior proteção antioxidante. A possibilidade de aplicação do produto para melhoria da qualidade de outras carnes, como a de coelho, frangos, bois e vacas é plausível. No entanto, o sistema digestivo do animal condiciona a incorporação do suplemento, por exemplo, para os ruminantes, prevê-se que sejam necessárias maiores quantidades de produto uma vez que, o processo de bioidrogenação poderá comprometer a sua absorção a nível intestinal. O estudo realizado acerca do *Mega Sense* foi muito abrangente, de modo, a perceber quais as frentes de atividade do mesmo, sugere-se um estudo mais detalhado, como por

exemplo, em que fase da peroxidação lipídica é que o impacto do produto é mais significativo, qual o efeito, se existir, do produto antes e durante o abate.

Relativamente, ao processo de validação, este ainda se encontra numa fase muito inicial pelo que, as conclusões que se poderão retirar são muito poucas, uma vez que, apenas que uma das etapas iniciais se encontra realizada e, necessita de melhorias. As curvas de calibração obtidas foram lineares, porém a veracidade desta afirmação pode ser comprometida, já que quaisquer alterações podem afetar a linearidade e, além disso esta gama de trabalho é demasiado curta, e, portanto, pouco abrangente.

Capítulo 7 – Bibliografía

1. Zhang, W., Xiao, S. & Ahn, D. U. Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 1191–1201 (2013).
2. Cannon, J. E., Morgan, J. B. & Heavner, J. Pork Quality Audit : a Review of the Factors Influencing Pork Quality. *J. Muscle Foods* **6**, 369–402 (1995).
3. Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F. & Therkildsen, M. Feeding and meat quality - A future approach. *Meat Sci.* **70**, 543–554 (2005).
4. Wood, J. D., Richardson, R. I. & Nute, G. R. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci.* **66**, 21–32 (2004).
5. Wood, J. D., Enser, M. & Fisher, A. V. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* **78**, 343–358 (2008).
6. Karlsson, A. H., Klont, R. E. & Fernandez, X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livest. Prod. Sci.* **60**, 255–269 (1999).
7. Mancini, R. A. & Hunt, M. C. Current research in meat color. *Meat Sci.* **71**, 100–121 (2005).
8. Thorstensson, A. & Karlsson, J. Fatiguability and fibre composition of human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **98**, 318–22 (1976).
9. Abouelkaram, S. *et al.* Effects of muscle texture on ultrasonic measurements. *Food Chem.* **69**, 447–455 (2000).
10. Tornberg, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* **70**, 493–508 (2005).
11. Solomon, M. B., van Laack, R. L. & Eastridge, J. S. Pork and Poultry Muscle : a Review. *J. Muscle Foods* **9**, 1–11 (1998).
12. Briskey, E. J. & Wismer-Pedersen, J. Biochemistry of Pork Muscle Structure. 1. Rate of Anaerobic Glycolysis and Temperature Change versus the Apparent Structure of Muscle Tissue. *J. Food Sci.* **26**, 297–305 (1961).
13. Cameron, N. D. & Enser, M. B. Fatty acid composition of lipid in Longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality. *Meat Sci.* **29**, 295–307 (1991).
14. Lonergan, S. M. *et al.* Influence of lipid content on pork sensory quality within pH classification. *J. Anim. Sci.* **85**, 1074–1079 (2007).
15. Ellis, M., Webb, A. J., Avery, P. J. & Brown, I. The influence of terminal sire genotype, sex, slaughter weight, feeding regime and slaughter-house on growth performance and carcass and meat quality in pigs and on the organoleptic properties of fresh pork. *Anim. Sci.* **62**, 521–530 (1996).
16. Raes, K., De Smet, S. & Demeyer, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **113**, 199–221 (2004).
17. Ballin, N. Z. Authentication of meat and meat products. *Meat Sci.* **86**, 577–587 (2010).
18. Pietrzak, M., Greaser, M. L. & Sosnicki, A. A. Effect of Rapid Rigor Mortis Processes on Protein Functionality in Pectoralis Major Muscle of Domestic Turkeys. *J. Anim. Sci.* **75**, 2106–2116 (1997).
19. Affentranger, P., Gerwig, C., Seewer, G. J. F., Schwörer, D. & Künzi, N. Growth and carcass characteristics as well as meat and fat quality of three types of pigs under different feeding regimens. *Livest. Prod. Sci.* **45**, 187–196 (1996).
20. Li, C., Liu, D. & Zhou, G. Meat quality and cooking attributes of thawed pork with different low field NMR T 21. *Meat Sci.* **92**, 79–83 (2012).
21. Grajales-Lagunes, A., Rivera-Bautista, C. & Ruiz-Cabrera, M. Effect of lactic acid on the meat quality properties and the taste of pork Serratus ventralis muscle. *Agric. Food Sci.* **21**, 171–181 (2012).

22. Wood, J. D., Brown, S. N. & Nute, G. R. Effects of breed, feed level and conditioning time on the tenderness of pork. *Meat Sci.* **44**, 105–112 (1996).
23. Marshall, K. & Le Thi Thanh Huyen. *Pig breeds and breeding operations in Nghe an province, Vietnam, with a focus on the smallholder pig sector.* (CGIAR, 2016).
24. Ller, E. M., Moser, G., Bartenschlager, H. & Geldermann, H. Trait values of growth, carcass and meat quality in Wild Boar, Meishan and Pietrain pigs as well as their crossbred generations. *J. Anim. Breed. Genet* **11711**, 189–202 (2000).
25. Roongsitthichai, A. & Tummaruk, P. The importance of backfat thickness to reproductive performance in female pigs Importance of Backfat Thickness to Reproductive Performance in Female Pigs. *Thai Vet. Med.* **44**, 171–178 (2015).
26. Alfredo, F. A. T. *Porco Bísaro - Qualidade da carcaça e da carne.* (Quinta do Bísaro, 2015).
27. Petek, M. & Dikmen, S. The effects of prestorage incubation and length of storage of broiler breeder eggs on hatchability and subsequent growth performance of progeny. *Czech J. Anim. Sci.* **51**, 73–77 (2006).
28. Simpson, B. K. Food Biochemistry and Food Processing. in *Food Biochemistry and Food Processing* (eds. Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Gopinadhan, P. & Hui, Y. H.) 303–314 (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
29. Simpson, B. K. Food Biochemistry and Food Processing. in *Food Biochemistry and Food Processing* (eds. Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Gopinadhan, P. & Hui, Y. H.) 287–302 (John Wiley & Sons, Inc., 2012).
30. Borch, E., Kant-Muermans, M. L. & Blixt, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 103–120 (1996).
31. Sebranek, J. G. & Bacus, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Sci.* **77**, 136–147 (2007).
32. Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. & Pérez-Alvarez, J. A. Effect of Sodium Chloride, Sodium Tripolyphosphate and pH on Color Properties of Pork Meat. *Color Res. Appl.* **29**, 67–74 (2004).
33. Gray, J. I., Gomaa, E. A. & Buckley, D. J. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* **43**, 111–123 (1996).
34. Estévez, M. What's New in Meat Oxidation ? in *New Aspects of Meat Quality* (ed. Peter P. Purslow) 91–109 (Woodhead Publishing, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100593-4/00006-0
35. Balboa, M. A. & Balsinde, J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 385–391 (2006).
36. Lahucky, R., Nuernberg, K., Kovac, L., Bucko, O. & Nuernberg, G. Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts - In vitro and in vivo experiments on pork. *Meat Sci.* **85**, 779–784 (2010).
37. Monahan, F. J., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Lynch, P. B. & Gray, J. I. Influence of dietary fat and a-tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Sci.* **31**, 229–241 (1992).
38. Monahan, F. J., Asghar, A. & Gray, J. I. Effect of oxidized dietary lipid and vitamin E on the colour stability of pork chops. *Meat Sci.* **37**, 205–215 (1994).
39. Ahn, J., Grün, I. & Fernando, L. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *J. Food Sci.* **67**, 1364–1369 (2002).
40. Aristoy, M. C. & Toldrá, F. Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Sci.* **50**, 327–332 (1998).
41. McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. & Buckley, D. J. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Sci.* **58**, 45–52 (2001).

42. Mc Carthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B. & Buckley, D. J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci.* **57**, 177–184 (2001).
43. Wood, J. D. & Enser, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* **78**, 49–60 (1997).
44. Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715–725 (1993).
45. Larzul, C., Lefaucheur, L. & Ecolan, P. Phenotypic and genetic parameters for longissimus muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass, and meat quality traits in large white pigs. *J. Anim. Sci.* **75**, 3126–3137 (1997).
46. Rojas, M. C. & Brewer, M. S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of frozen, vacuum-packaged beef and pork. *J. Food Qual.* **31**, 173–188 (2008).
47. Faustman, C., Sun, Q. & Mancini, R. Myoglobin and lipid oxidation interactions : Mechanistic bases and control. *Meat Sci.* **86**, 86–94 (2010).
48. Decker, E. A., Elias, R. J. & McClements, D. J. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications Volume 2: Management in different industry sectors.* **2**, (Woodhead Publishing, 2010).
49. Phillips, A. L., Faustman, C. & Lynch, M. P. Effect of dietary alpha-tocopherol supplementation on color and lipid stability in pork. *Meat Sci.* **58**, 389–393 (2001).
50. Shahidi, F. & Pegg, R. B. Hexanal as an Indicator of the Flavor Deterioration of Meat and Meat Products. *Lipids food flavors* **1**, 256–279 (1994).
51. Trout, G. R. Variation in Myoglobin Denaturation and Color of Cooked Beef, Pork, and Turkey Meat as Influenced by pH, Sodium Chloride, Sodium Tripolyphosphate, and Cooking Temperature. *J. Food Sci.* **54**, 536–540 (1989).
52. King, N. J. & Whyte, R. Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. *J. Food Sci.* **71**, 31–40 (2006).
53. Qiao, J., Wang, N. & Ngadi, M. O. Prediction of drip-loss, pH, and color for pork using a hyperspectral imaging technique. *Meat Sci.* **76**, 1–8 (2007).
54. Wismer-Pedersen, J. Use of Haemoglobin in Foods-A review. *Meat Sci.* **24**, 31–45 (1998).
55. Sen, A. R., Naveena, B. M. & Muthukumar, M. Colour, myoglobin denaturation and storage stability of raw and cooked mutton chops at different end point cooking temperature. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 970–975 (2014).
56. Suman, S. P. & Joseph, P. Myoglobin Chemistry and Meat Color. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **4**, 79–99 (2013).
57. Zeola, N. M. B. L., Souza, P. A. & Souza, H. B. A. Cor, capacidade de retenção de água e maciez da carne de cordeiro maturada e injetada com cloreto de cálcio. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **59**, 1058–1066 (2007).
58. Guerrero, L., Gou, P. & Arnau, J. The influence of meat pH on mechanical and sensory textural properties of dry-cured ham. *Meat Sci.* **52**, 267–273 (1999).
59. Lesiów, T. & Xiong, Y. L. A simple, reliable and reproductive method to obtain experimental pale, soft and exudative (PSE) pork. *Meat Sci.* **93**, 489–494 (2013).
60. Bidner, B. S., Ellis, M. & Brewer, M. S. Effect of Ultimate pH on the quality characteristics of pork. *J. Muscle Foods* **15**, 139–154 (2004).
61. Christensen, L., Ertbjerg, P., Aaslyng, M. D. & Christensen, M. Effect of prolonged heat treatment from 48°C to 63°C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Sci.* **88**, 280–285 (2011).
62. Abril, M., Campo, M. M. & Onenc, A. Beef color evolution as a function of ultimate pH. *Meat Sci.*

- 58**, 69–78 (2001).
63. Adzitey, F. & Nurul, H. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *Int. Food Res. J.* **18**, 11–20 (2011).
 64. Sapirstein, A. & Bonventre, J. V. Phospholipases A2 in ischemic and toxic brain injury. *Neurochem. Res.* **25**, 745–753 (2000).
 65. Pearce, K. L., Rosenfold, K., Andersen, H. J. & Hopkins, D. L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. *Meat Sci.* **89**, 111–124 (2011).
 66. Barbieri, G., Bolzoni, L. & Parolari, J. G. Flavor Compounds of Dry-Cured Ham. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2389–2394 (1992).
 67. Miltenburg, G. A., Wensing, T., Smulders, F. J. & Breukink, H. J. Relationship between blood hemoglobin, plasma and tissue iron, muscle heme pigment, and carcass color of veal. *J. Anim. Sci.* **70**, 2766–2772 (1992).
 68. Pastorelli, G. *et al.* Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. *Meat Sci.* **65**, 571–580 (2003).
 69. Weston, A. R., Rogers, R. W. & Althen, T. G. Review: The Role of Collagen in Meat Tenderness. *Prof. Anim. Sci.* **18**, 107–111 (2002).
 70. Wenk, C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **16**, 282–289 (2003).
 71. Wood, J. D. *et al.* Animal Nutrition and Metabolism Group Symposium on ‘Improving meat production for future needs’ Manipulating meat quality and composition. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 363–370 (1999).
 72. Buckley, D. J., Morrissey, P. A. & Gray, J. I. Influence of Dietary Vitamin-E on the Oxidative Stability and Quality of Pig Meat. *J. Anim. Sci.* **73**, 3122–3130 (1995).
 73. White, T. Tannins-their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.* **8**, 377–385 (1957).
 74. Chaijan, M. Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **30**, 47–53 (2008).
 75. Moroney, N. C., Grady, M. N. O. & Doherty, J. V. O. Addition of seaweed (*Laminaria digitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets : Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. *MESC* **92**, 423–429 (2012).
 76. Migotto, D. L., Costa, B. & Miyada, V. S. Effects of dietary hop (*Humulus lupulus L.*)- beta-acids on quality attributes , composition and oxidative stability of pork meat. *J. Agric. Food Chem.* **98**, 2385–2392 (2017).
 77. Ranucci, D., Beghelli, D. & Cavallucci, C. Dietary effects of a mix derived from oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil and sweet chestnut (*Castanea sativa Mill.*) wood extract on pig performance , oxidative status and pork quality traits. *MESC* **100**, 319–326 (2015).
 78. Pastorelli G., Rossi R., Ratti S., C. C. Plant extracts in heavy pig feeding: effects on quality of meat and Cremona salami. *Anim. Prod. Sci.* **56**, 1199–1207 (2015).
 79. Hanczakowska, E. & Grela, E. R. Effect of dietary inclusion of a herbal extract mixture and different oils on pig performance and meat quality. **108**, 61–66 (2015).
 80. Inserra, L., Luciano, G. & Bella, M. Effect of including carob pulp in the diet of fattening pigs on the fatty acid composition and oxidative stability of pork. *Meat Sci.* **100**, 256–261 (2015).
 81. Rybarczyk, A., Matysiak, B., Jacyno, E., Pietruszka, A. & Kawęcka, M. Science Effect of dietary plant extracts mixture on pork meat quality. **4702**, (2011).
 82. Conformity Assessment, C. International Standard-General requirements of testing and calibration laboratories. *Int. Organ. Stand.* **17025**, 1–38 (2017).

83. Slover, H. & Lanza, E. Quantitative Analysis of Food Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 933–943 (1979).
84. Zhang, H., Wang, Z. & Liu, O. Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *J. Pharm. Anal.* **5**, 223–230 (2015).
85. Shantha, N. C. & Napolitano, G. E. Gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr. A* **624**, 37–51 (1992).
86. Grob, K. Splitless injection on capillary columns, part i. conditions and limits, practical realization. *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 584–586 (1969).
87. Grob, K. Splitless injection on capillary columns, part ii. conditions and limits, practical realization. *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 587–591 (1969).
88. Supelco. *Analyzing Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography Key Words : Analysis* (1998).
89. CHROMacademy. Theory and Instrumentation of GC Sample Introduction. in *Crawford Scientific* 1–39 (2012). doi:www.chromacademy.com
90. Seppänen-Laakso, T., Laakso, I. & Hiltunen, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal. Chim. Acta* **465**, 39–62 (2002).
91. Martin, A. & Synge, R. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases: A Theory of Chromatography 2. Application To the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins. *Biochem. J.* **35**, 1358–1368 (1941).
92. Christie, W. W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal. *J. Chromatogr. A* **447**, 305–314 (1988).
93. ChromLab Communications. *TotalChrom™ Tips*. **1**, (2010).
94. PerkinElmer. *Clarus 500 - Gas Chromatograph*. (2010).
95. James, A. T. & Martin, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.* **50**, 679–690 (1952).
96. A. Skoog, D., Holler, F. J. & R. Crouch, S. Principles of Instrumental Analysis. in *Principles of Instrumental Analysis* 696–741 (Cengage Learning, 2017).
97. Klinkenberg, A. & Zuiderweg, F. J. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* **5**, 271–289 (1956).
98. Berthed, A., Li, W. & Armstrong, D. W. Multiple Enantioselective Retention Mechanisms on Derivatized Cyclodextrin Gas Chromatographic Chiral Stationary Phases. *Anal. Chem.* **64**, 873–879 (1992).
99. Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509 (1957).
100. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
101. Niehaus, W. G. & Ryhage, R. Determination of Double Bond Positions in Polyunsaturated Fatty Acids by Combination Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **40**, 1840–1847 (1968).
102. Luque de Castro, M. D. & García-Ayuso, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* **369**, 1–10 (1998).
103. Aldai, N., Osoro, K., Barrón, L. J. R. & Nájera, A. I. Gas-liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (cis9trans11 and trans10cis12 isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids: Application to the intramuscular fat of bee. *J. Chromatogr. A* **1110**, 133–139 (2006).
104. Yurchenko, S., Sats, A., Poikalainen, V. & Karus, A. Method for determination of fatty acids in

- bovine colostrum using GC-FID. *Food Chem.* **212**, 117–122 (2016).
105. Committees ISO/TC 69, Applications of statistical methods, T. International Standard-Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - part 2. *Int. Organ. Stand.* **1994**, 1–28 (1994).
 106. Valentini, S., Sommer, W. & Matioli, G. Validação de Métodos Analíticos. *Arq Mudi* **11**, 1–11 (2007).
 107. Castro Augusto; Cabrita, Luís; Marques, Aida; Contreiras, A. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química - Guia relacre 13. *Guia Relacre 13, Validação Métodos Internos Ens. em Análise Química* **13**, 50 (2000).
 108. Brito, N. M., Junior, O. D. P. A., Polese, L. & Ribeiro, M. L. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pestic. R.Ecotoxicol. e Meio Ambient.* **13**, 129–146 (2003).
 109. Petrović, M., Kezić, N. & Bolanča, V. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chem.* **122**, 285–291 (2010).
 110. Bressolle, F., Bromet-Petit, M. & Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **686**, 3–10 (1996).
 111. Sobrado, L. A., Freije-Carreló, L., Moldovan, M., Encinar, J. R. & Alonso, J. I. G. Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards. *J. Chromatogr. A* **1457**, 134–143 (2016).
 112. Committees ISO/TC 147, Water quality, T. International Standard-Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. *Int. Organ. Stand. First edit*, 1–10 (1990).
 113. Dunn, W. B., Broadhurst, D. & Begley, P. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **6**, 1060–1083 (2011).
 114. Expert Working Group, I. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int. Conf. Harmon.* 50 (2005).
 115. Peng, D., Bi, Y. & Ren, X. Detection and quantification of adulteration of sesame oils with vegetable oils using gas chromatography and multivariate data analysis. *Food Chem.* **188**, 415–421 (2015).
 116. Luna, P., Juárez, M. & De la fuente, M. A. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* **88**, 3377–3381 (2005).
 117. Soest, P. J. V. A. N., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583–3597
 118. Lien, K. A., Sauer, W. C. & He, J. M. Dietary influences on the secretion into and degradation of mucin in the digestive tract of monogastric animals and humans. 223–245 (2001).
 119. Cheng, J., Wang, S. & Ockerman, H. W. Meat Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Sci.* **75**, 71–77 (2007).
 120. Pulkrábek, J. & Pavlík, J. Pig carcass quality and pH1 values of meat. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 38–42 (2004).
 121. Lemanska, K., Szymusiak, P. & Tyrakowska, B. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **31**, 869–881 (2001).
 122. Scheffler, T. L. & Gerrard, D. E. MEAT Mechanisms controlling pork quality development : The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. **77**, 7–16 (2007).
 123. Lonergan, E. H., Zhang, W. & Lonergan, S. M. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *MESC* **86**, 184–195 (2010).

124. Trout, R. Variation in Myoglobin Denaturation and Color of Cooked Beef , Pork , and Turkey Meat as Influenced pH , Sodium Chloride , Sodium Tripolyphosphate , and Cooking Temperature. *J. Food Qual.* **54**, 536–544 (1989).
125. Yang, F. & Phillips, G. N. Crystal Structures of CO- , Deoxy- and Met- myoglobins at various pH values. *J. Mol. Biol.* **256**, 762–774 (1996).
126. Arcon, J. P., Rosi, P., Petruk, A. A., Marti, M. A. & Estrin, D. A. Molecular Mechanism of Myoglobin Autoxidation: Insights from Computer Simulations. *J. Phys. Chem.* **119**, 1802–1813 (2015).
127. Brewer, M. S., Zhu, L. G. & Bidner, B. Measuring pork color: Effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Sci.* **57**, 169–176 (2001).
128. Kim, T. W., Kim, C. W. & Yang, M. R. Pork Quality traits according to postmortem pH and temperature in berkshire. *J. Anim. Sci.* **36**, 29–36 (2016).
129. Leygonie, C., Britz, T. J. & Hoffman, L. C. Meat quality comparison between fresh and frozen/thawed ostrich M. iliofibularis. *Meat Sci.* **91**, 364–368 (2012).
130. Traore, S. *et al.* Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat Sci.* **90**, 917–924 (2012).
131. Lund, M. N., Heinonen, M. & Baron, C. P. Protein oxidation in muscle foods : A review. *Meat Sci.* **55**, 83–95 (2011).
132. Sperber, W. H. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria - A Review 1. *J. Food Prot.* **46**, 142–150 (1983).
133. Devatkal, S. K. & Naveena, B. M. Effect of salt , kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. *Meat Sci.* **85**, 306–311 (2010).
134. Andrée, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H. & Schwägele, F. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Sci.* **86**, 38–48 (2010).
135. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 515–540 (1990).
136. Bastida, S. *et al.* Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chem.* **116**, 748–754 (2009).
137. Bejerholm, C. & Aaslyng, M. D. The influence of cooking technique and core temperature on results of a sensory analysis of pork — depending on the raw meat quality. *Food Qual. Prefer.* **15**, 19–30 (2003).
138. Wood, D. & Enser, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* **78**, 49–60 (1997).
139. Jensen, C., Lauridsen, C. & Bertelsen, G. Dietary vitamin E : Quality and storage stability of pork and poultry. **9**, 62–72 (1998).
140. Dhindsa, R. S. & Thorpe, T. A. Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *J. Exp. Bot.* **32**, 93–101 (1981).
141. Buckley, D. J., Morrissey, P. A. & Gray, J. I. Influence of Dietary Vitamin E on the Oxidative Stability and Quality of Pig Meat 1. 3122–3130 (2014).
142. Buckley, D. J. *et al.* Effects of Dietary Antioxidants and Oxidized Oil on Membranal Lipid Stability and Pork Product Quality. *J. Food Sci.* **54**, 1193–1197 (1989).
143. Hornstein, I., Crowe, P. F. & Heimberg, M. J. Fatty Acid Composition of Meat Tissue Lipids. *J. Food Sci.* **26**, 581–586 (1961).
144. Gray, J. I. Measurement of Lipid Oxidation: A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 539–546 (1978).
145. Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation : and significanc & 3 its mechanism ,. *Am. J. Clin.*

Nutr. **57**, 715S–725S (1993).

146. Toldra, F. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality. **69**, (2000).

Capítulo 8– Anexos

Anexo 1 – Composição dos meios utilizados para as análises microbiológicas

a) Tabela 10 – Constituição do meio de cultura PSA

PCA – Buffered Peptone Water	
Tecido animal digerido enzimaticamente:	5,0g
Extrato fermentativo:	2,5g
Glucose anídrica (C ₆ H ₁₂ O ₆):	1,0g
Agar:	9g a 18g
Água:	1 000 mL

b) Tabela 11 – Constituição do meio de cultura Half-Fraser

Half - Fraser	
Tecido animal digerido enzimaticamente:	5,0g
Substrato enzimático de caseína:	5,0g
Extrato fermentativo:	5,0g
Extrato de carne:	5,0g
Cloreto de sódio:	20,0g
Fosfato dissódico hidrogenado desidratado:	12,0g
Fosfato de potássio dihidrogenado:	1,35g
Esculina:	1,0g
Água:	1 000 mL

c) Tabela 12 – Constituição do meio de cultura Baird – Parker

Baird - Parker	
Substrato enzimático de caseína:	10,0g
Extrato fermentativo:	1,0g
Extrato de carne:	5,0g
Piruvato de sódio:	10,0g
L-Glicina:	12,0g
Cloreto de lítio:	5,0g
Agar:	12,0g a 22,0g
Água:	1 000 mL

d) Tabela13 – Constituição do meio de cultura Brain – Heart

Brain - Heart	
Tecido animal digerido enzimaticamente:	10,0g
Infusão desidratada de cérebro de vitela:	12,5g
Infusão desidratada de coração de vaca:	5,0g
Glucose:	2,0g
Cloreto de sódio:	5,0g
Hidrogenofosfato dissódico anídrico (Na ₂ HPO ₄):	2,5g
Água:	1 000 mL

e) Tabela 14 – Constituição do meio de cultura DG18

DG18 – Dichloran 18% glycerol agar	
Substrato enzimático de caseína:	5,0g
D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆):	10,0g
Dihidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄) :	1,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ •H ₂ O):	0,5g
Diclorano (2,6 – dicloro-4-nitroanilina):	0,002g
Glicerol anídrico	220g
Agar:	12g a 15g
Clorofenicol:	0,1g
Água:	1 000 mL

f. Tabela 15 – Constituição do meio de cultura MSRV

MSRV – Modified semi-solid rappaport-vassiliadis agar	
Tecido animal e vegetal digerido enzimaticamente:	4,6g
Hidrolisado ácido de caseína:	4,6g
Fosfato de monopotássio:	1,5g
Cloreto de magnésio anídrico:	10,9g
Cloreto de sódio:	7,3g
Oxalato:	0,04g
Novobiocina:	0,01g
Agar:	2,70g
Água:	1 000 mL

g. Tabela 16 - Constituição do meio de cultura TBX

TBX – Tryptone – Bile – X - Glucuronate	
Triptona:	20,0g
Sais biliares:	1,5g
BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indol – β -D-glucuronato :	75,0 mg
Agar:	12g a 15g
Água:	1 000 mL

Anexo 2 – Lombo curado: concentração de malondialdeído – continuação da tabela de resultados 4.

Tabela 17– Tabela complemento dos valores obtidos na determinação da concentração de malondialdeído (mg de malondialdeído/ 1000 g de amostra) para as amostras de lombo curado na presença e ausência do *Mega Sense*, para um intervalo de 95% de confiança.

<i>Lombo Curado</i> ^a			
<i>[malondialdeído]</i> (mg de malondialdeído/ 1000 g de amostra)			
SM_5	1,7913	0,8321	CM_5
SM_6	1,7513	0,9385	CM_6
SM_7	1,8154	1,0758	CM_7
SM_8	1,7374	0,7923	CM_8
SM_9	1,8697	0,8891	CM_9
SM_10	1,7504	0,7501	CM_10
SM_11	1,7172	0,7493	CM_11
SM_12	1,9100	0,8187	CM_12
SM_13	2,0394	0,8086	CM_13
SM_14	1,8850	0,8769	CM_14
SM_15	1,9297	0,7578	CM_15
SM_16	1,9876	0,7761	CM_16
SM_17	2,1556	0,8117	CM_17
SM_18	2,0137	0,7830	CM_18
SM_19	1,9309	0,8516	CM_19
SM_20	1,9188	0,7584	CM_20
<i>Média</i>	1,8480	0,8591	<i>Média</i>
<i>s</i>	0,1275	0,1240	<i>s</i>
<i>SE</i> ^e	p<0,05^d		

^{a, b}– Os valores da média e do desvio padrão foram calculados com base nos resultados obtidos para a totalidade das amostras, em cada grupo;

^c – SE – significância estatística;

^d– p<0,05, estatisticamente significativo, para a análise estatística t-student, num intervalo de confiança de 95.

Anexo 3 – Cromatogramas obtidos para todas as amostras de lombo curado analisadas na ausência de *Mega Sense*

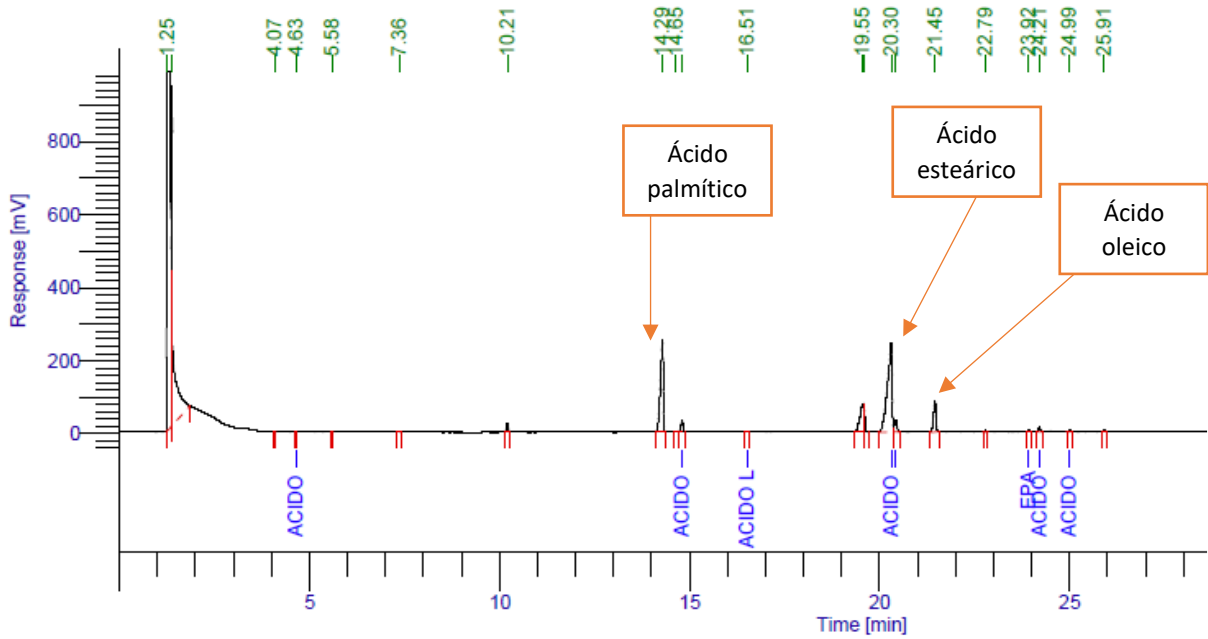


Figura 21 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_1.

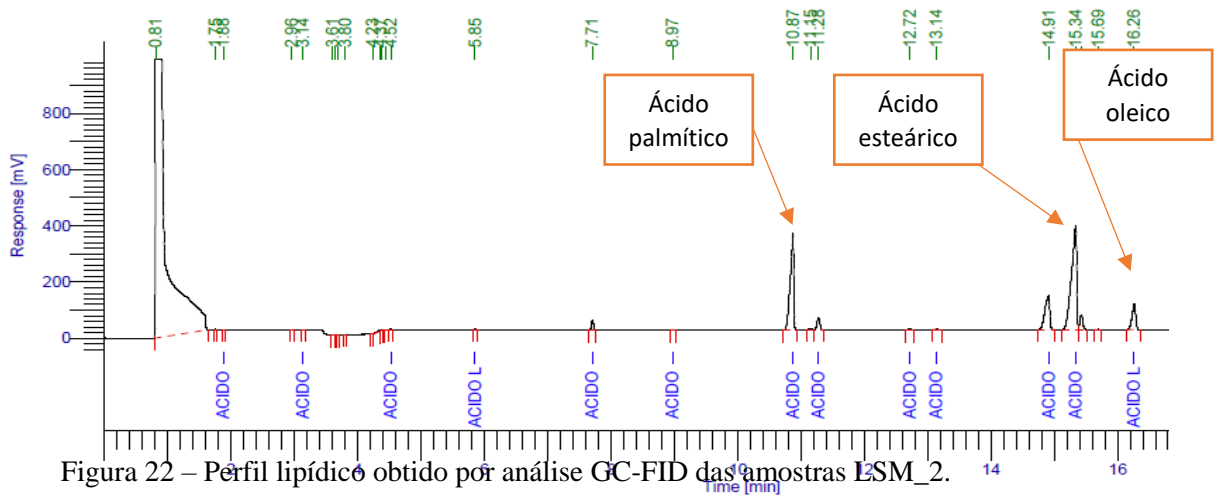


Figura 22 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_2.

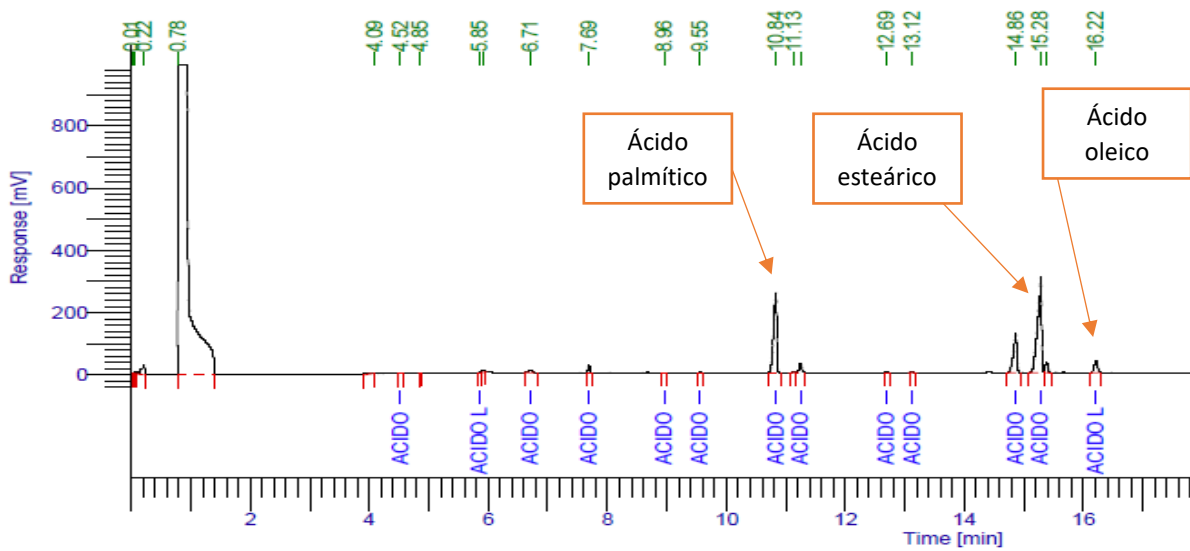


Figura 23 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_3.

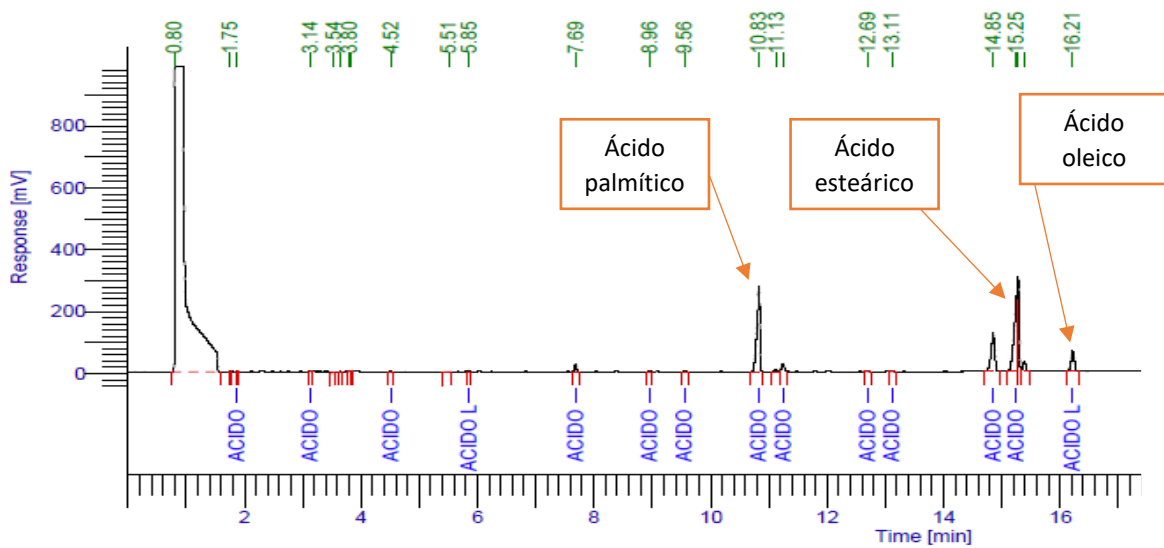


Figura 24 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_4.

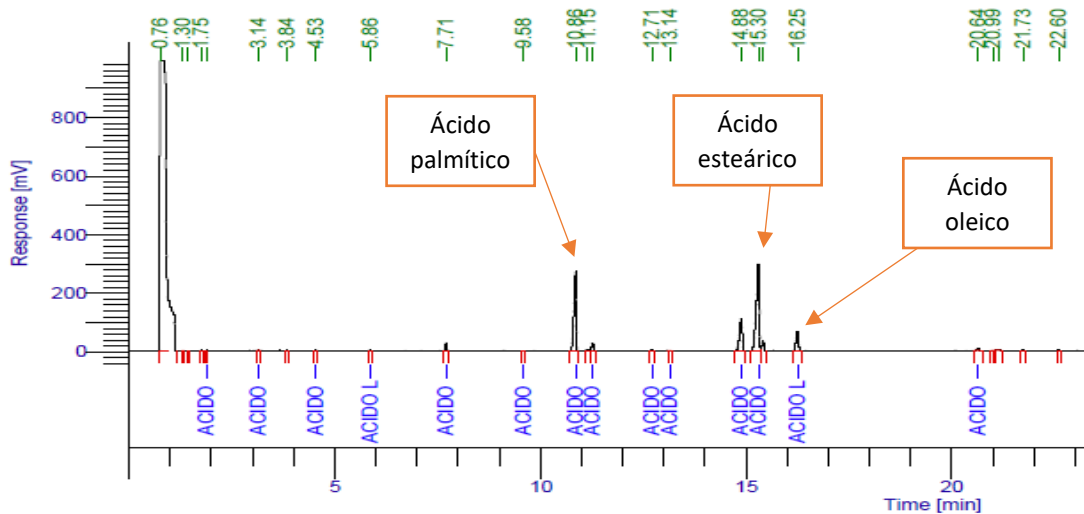


Figura 25 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_5.

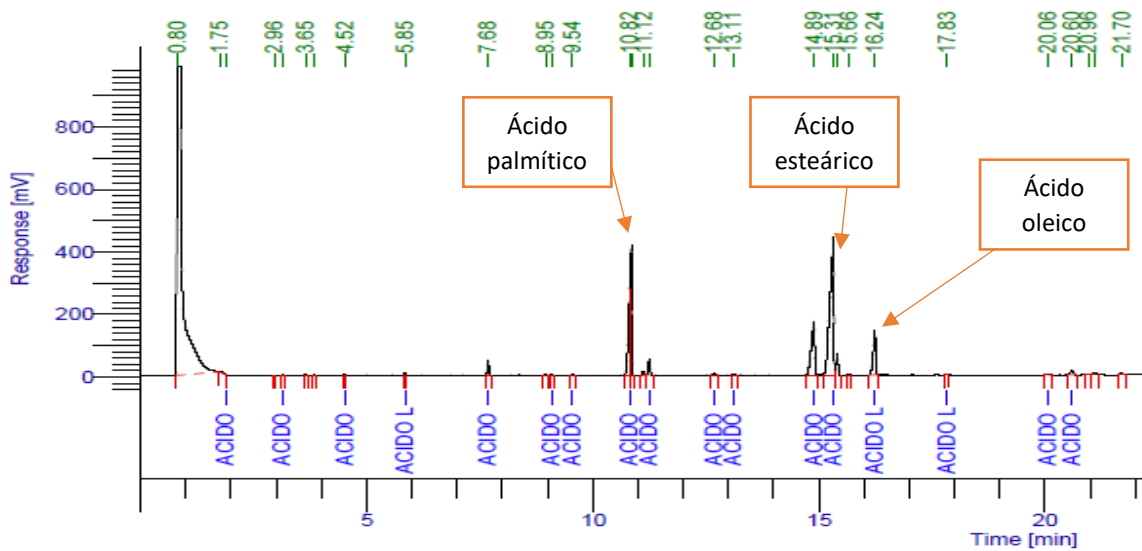


Figura 26 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_6.

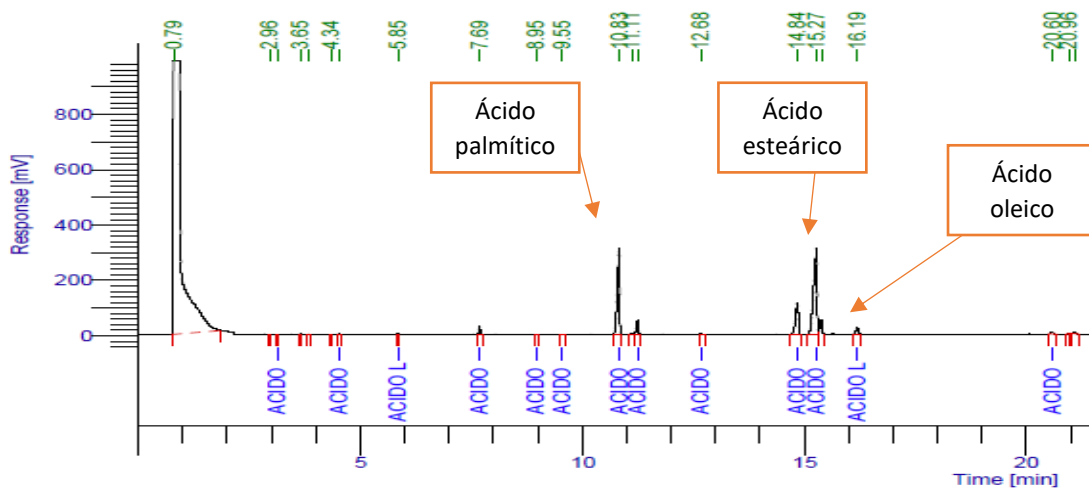


Figura 27 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_7.

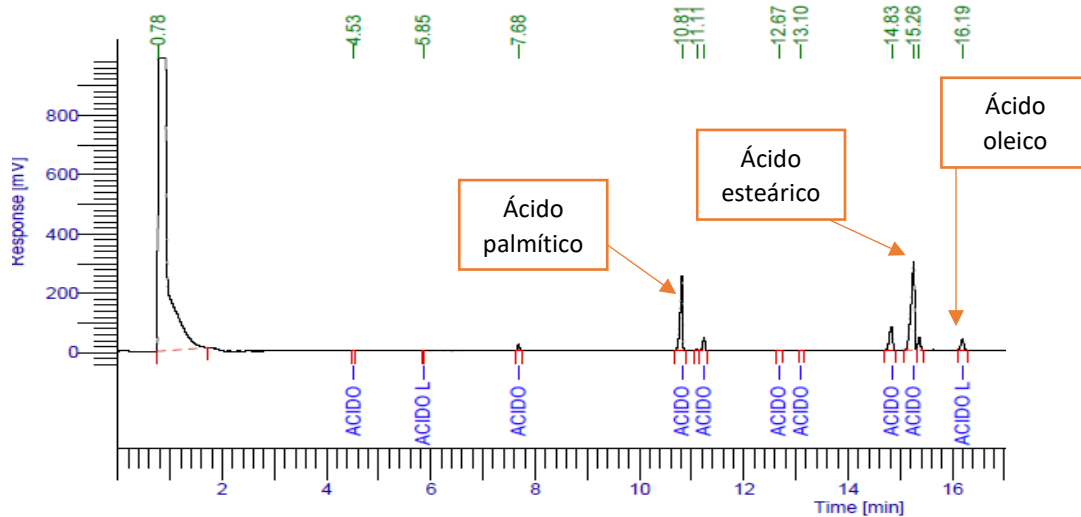


Figura 28 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_8.

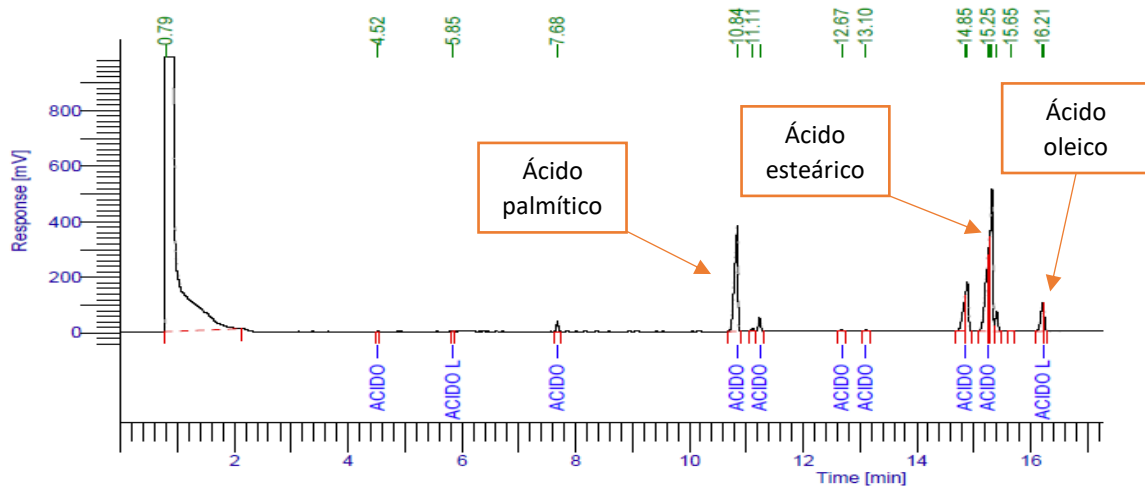


Figura 29 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_9.

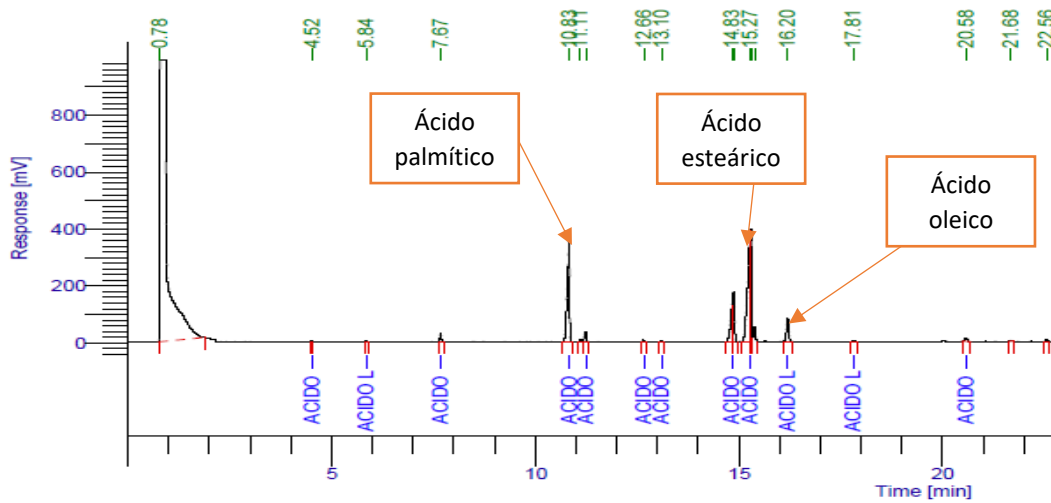


Figura 30 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_10.

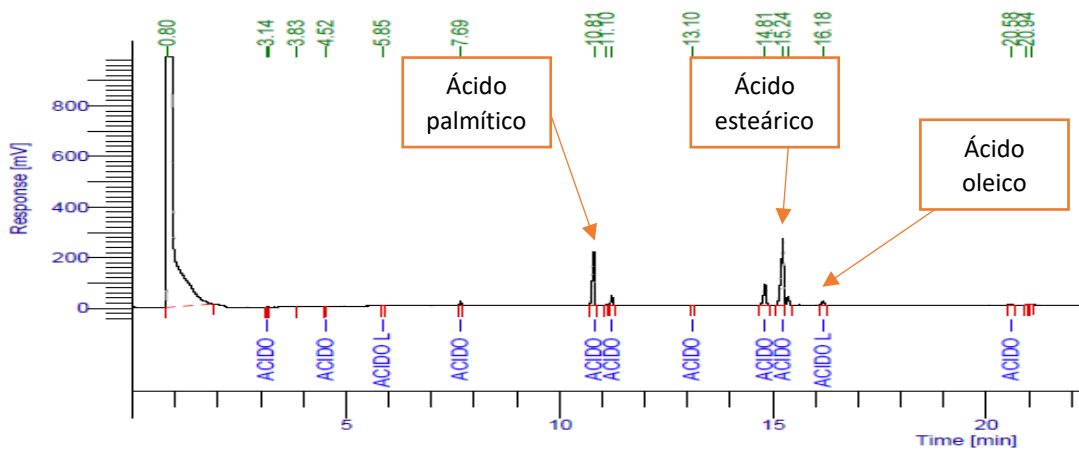


Figura 31 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_11.

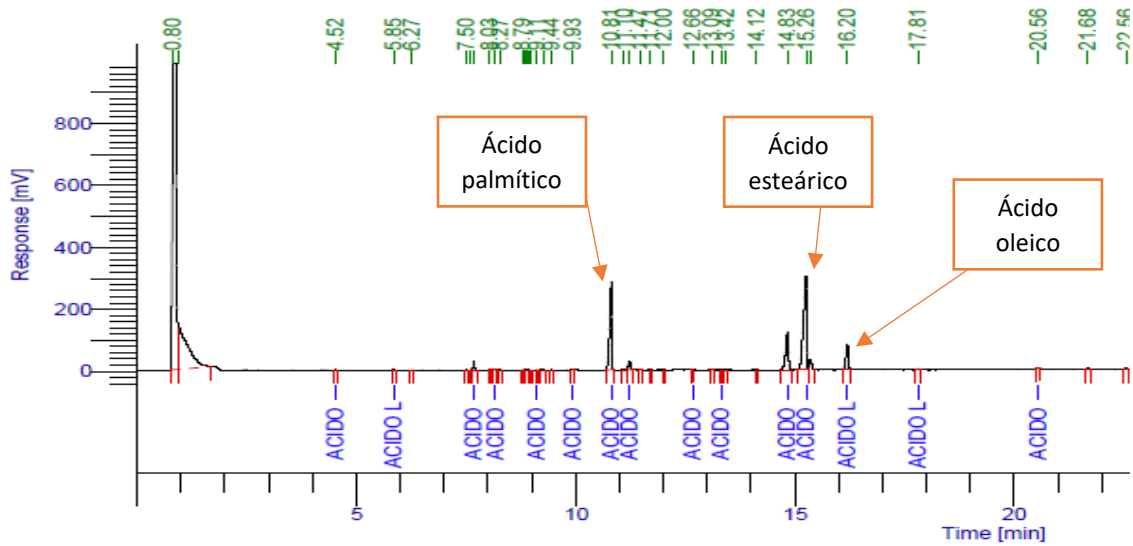


Figura 32 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_12.

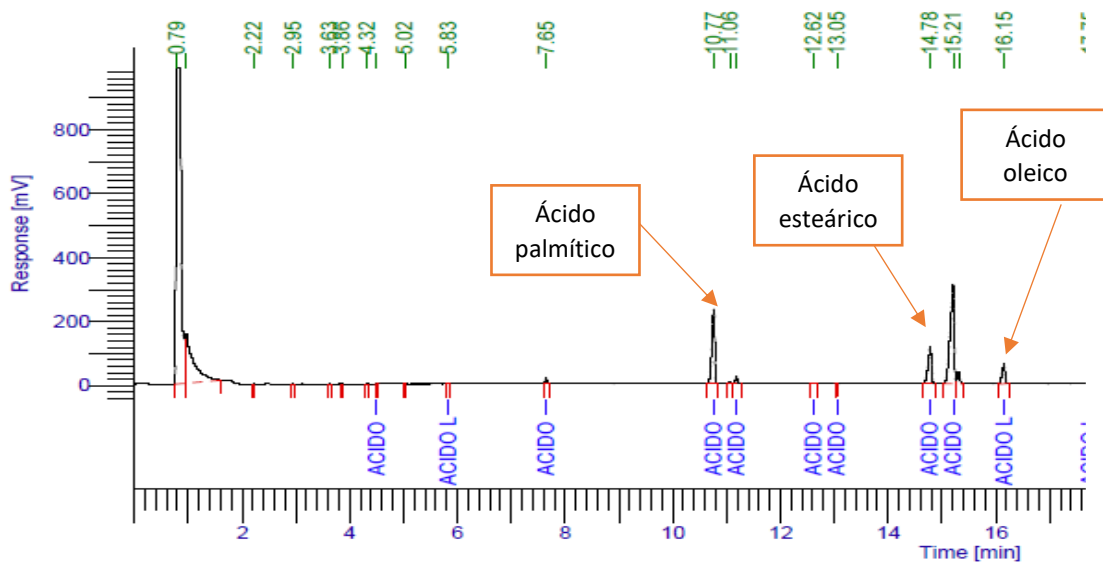


Figura 33 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_13.

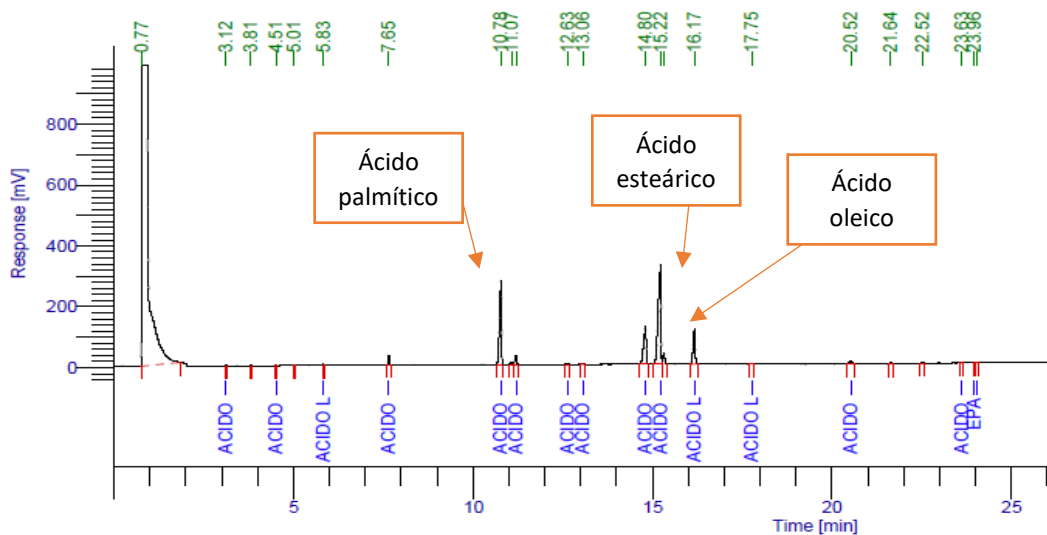


Figura 34 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_14.

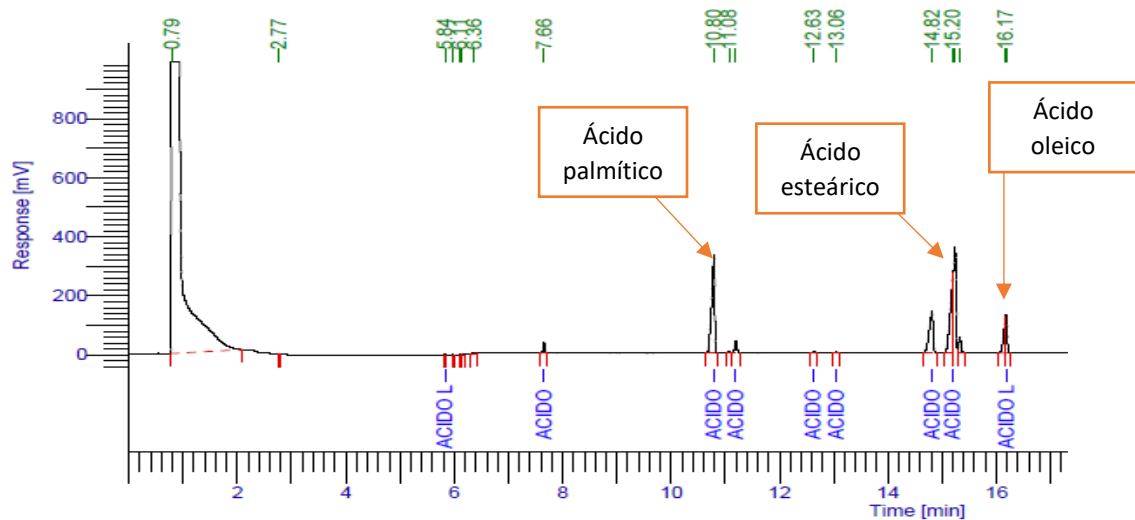


Figura 35 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_15.

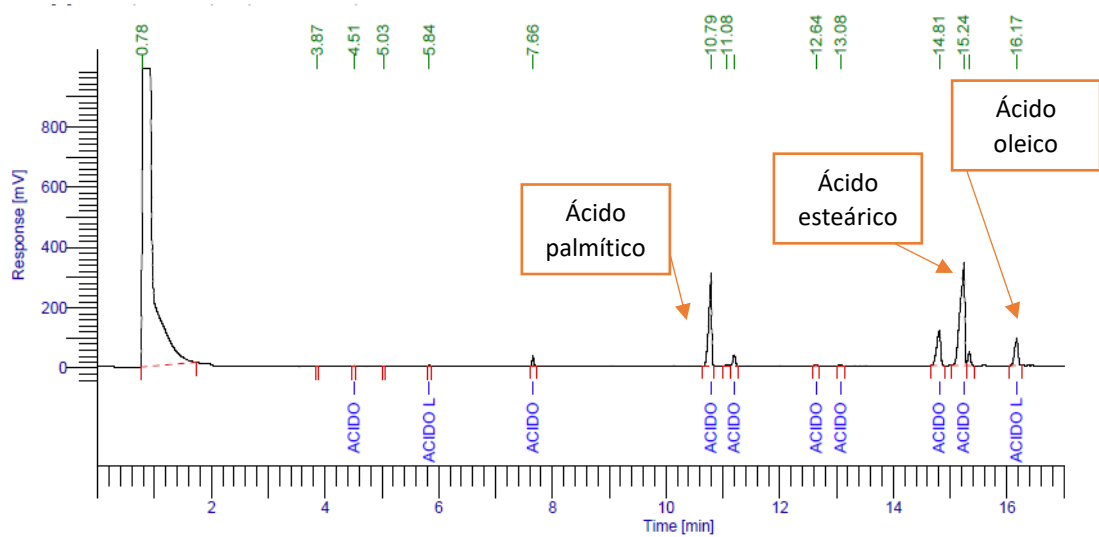


Figura 36 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_16.

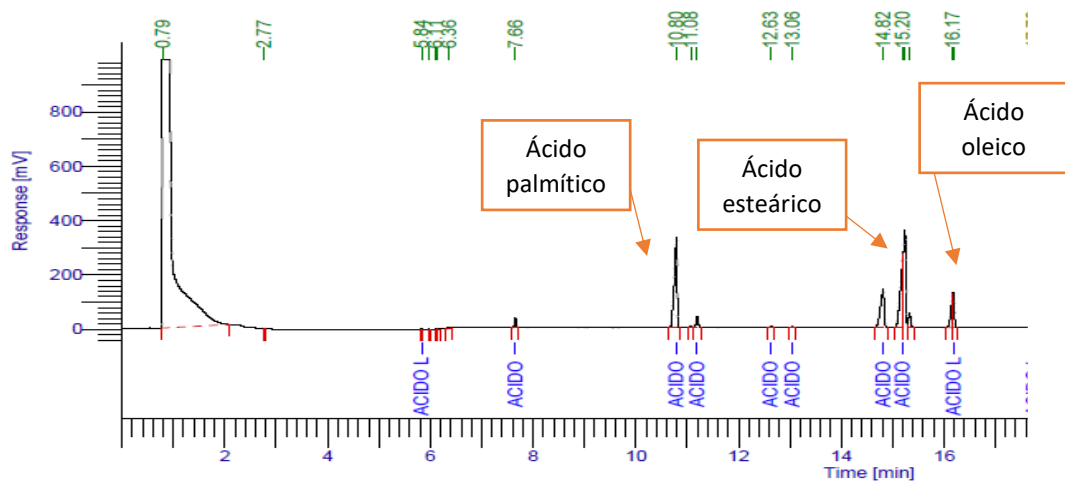


Figura 37 – Perfil lipídico obtido por análise GC-FID das amostras LSM_17.