

**Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais  
à Base de Tomilho Bela-luz: um Projeto com  
Reconhecido Interesse para a Indústria  
Alimentar e para o Consumidor**

Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David Gomes, Marta  
Henriques, Fernanda M. Ferreira & Carlos Dias Pereira

Artigo integrado na  
**Parte 2 "Domínio das Ciências Agrárias e Alimentares"**  
da publicação.

**Páginas do artigo**  
83 a 109

**Título da Publicação**  
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

**Coordenação**  
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,  
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

**Data de publicação**  
Fevereiro de 2017

**Editor**  
CINEP/IPC

**ISBN (impresso)** 978-989-99463-0-9

**ISBN(ebook)** 978-989-99463-1-6

## Nota biográfica

### Filipa **Carvalho**

Licenciada em Biotecnologia pela Escola Superior Agrária de Coimbra (2013). Estudante de Mestrado em Ciências do Consumo e Nutrição na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (2015-2017). Destaca-se a participação no projeto de Investigação e Empreendedorismo "Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo: os benefícios da redução do teor de sal e da eliminação de produtos químicos durante o processo de cura" e, a participação em comunicações científicas visando a divulgação do mesmo.

### Ana **Rodrigues**

Licenciada em Biotecnologia em 2013 na Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra. Entre 2014 e 2015 foi promotora de um projeto de investigação, desenvolvimento e inovação que visou o estudo das propriedades do tomilho bela-luz e a sua aplicação na produção biológica de queijo, no âmbito do programa Passaporte para o Empreendedorismo. Atualmente frequenta o curso de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Instituto Politécnico de Castelo Branco.

### David **Gomes**

Professor Adjunto convidado do Instituto Politécnico de Coimbra, Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da Escola Superior Agrária. Tem colaborado na lecionação das unidades curriculares Oficinas Tecnológicas de Processamento de Lácteos, Introdução à Tecnologia Alimentar e Embalagens de Produtos Alimentares. Mestre em Agropecuária (2009) e Especialista em Indústrias Alimentares (2015) é responsável pela Oficina Tecnológica de Lacticínios (OTL). Tem participado em diversos trabalhos de investigação e determinações específicas com carácter experimental, desenvolvidas na OTL e em laboratório. Dá apoio a empresas do sector de lacticínios, através de protocolos e parcerias estabelecidas com a ESAC.



## Marta **Henriques**

Doutorada em Engenharia Química na especialidade de Processos Químicos pela Universidade de Coimbra, é mestre em Engenharia Bioquímica (2005) e licenciada em Engenharia Química (2001). É Professora Adjunta no Politécnico de Coimbra, Departamento de Ciências e Tecnologia Alimentar da ESAC, e coordenadora do Curso Técnico Superior Profissional em Qualidade Alimentar. Leciona aos cursos de Licenciatura em Biotecnologia, Engenharia Alimentar e Mestrado em Engenharia Alimentar.

É investigadora integrada no CERNAS/IPC, no grupo de Ciências e Engenharia Alimentar, e foca-se na valorização de subprodutos da indústria alimentar para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores tendo em vista a sustentabilidade industrial. Colaborou e coordenou vários projetos nacionais e internacionais de I&D. É autora e co-autora em 2 patentes, tendo publicado diversos artigos e capítulos de livros em revistas e edições científicas da especialidade.

## Fernanda M. **Ferreira**

Licenciada em Bioquímica pela Universidade de Coimbra (1993). Pela mesma universidade obteve o grau de Mestre em Biologia Celular (1998) e de Doutor em Biologia (2006).

Iniciou a sua atividade profissional em 2005/2006 na Escola Superior Agrária de Coimbra, onde atualmente é Professor Adjunto. Tem lecionado unidades curriculares nas áreas da Biologia, Fisiologia Celular e Bioenergética, Química Alimentar e Ecotoxicologia. Tem participado em diversos trabalhos de investigação, nas áreas da Toxicologia Bioquímica, Bioenergética Mitocondrial, aplicada também às Plantas Aromáticas e Medicinais. Tem atualmente 29 publicações científicas em revistas internacionais da especialidade. É Investigador no CITAB/UTAD.

## Carlos **Dias Pereira**

Licenciado em Medicina Veterinária pela FMV/UTL (P), Mestre em ciências alimentares pela Universidade de Reading (UK) e Doutor em Ciência e Engenharia dos Alimentos pela Universidade de Santiago de Compostela (ES). Professor Coordenador na Escola Superior Agrária de Coimbra e director do Instituto de Investigação Aplicada do Politécnico de Coimbra. Membro efectivo do Centro de Estudos dos Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS). Desde 2003 coordenou diversos projectos de I&D desenvolvidos na ESAC, bem

como projectos e parcerias no âmbito da educação/desenvolvimento a nível internacional, nomeadamente em países da CPLP. É autor/co-autor de 16 publicações em revistas internacionais, de 4 capítulos de livros e de 5 livros. É também autor/co-autor de cerca de 80 comunicações em congressos internacionais, sob a forma de comunicações orais ou poster.

## **Desenvolvimento de Novos Produtos Naturais à Base de Tomilho Bela-luz: um Projeto com Reconhecido Interesse para a Indústria Alimentar e para o Consumidor**

Filipa Carvalho, Ana Rodrigues, David Gomes, Marta  
Henriques, Fernanda M. Ferreira & Carlos Dias Pereira

A crescente preocupação da população com a qualidade e segurança dos alimentos, nomeadamente com a ingestão de aditivos alimentares que possam causar efeitos nefastos no organismo e no ambiente, tem dinamizado a procura de alternativas naturais e biológicas desses produtos. No caso da produção industrial de queijo recorre-se regularmente à utilização de antibióticos (natamicina) ao longo do período de maturação, de forma a garantir o controlo do crescimento microbiano. Contudo, esta prática não se revela eficaz para todos os tipos de microrganismos e a sua aplicação nem sempre é feita nas concentrações adequadas.

A utilização de plantas aromáticas na produção artesanal de queijo não é algo determinadamente inovador, sendo já uma prática comum em algumas regiões do país, mas com um cunho marcadamente empírico, numa perspetiva etnobotânica e etnofarmacológica. Partindo do pressuposto que o uso empírico destas espécies e os saberes e práticas a elas associadas foram ratificados e confirmados ao longo de gerações de consumidores, é de considerar o seu potencial fitoquímico, fitofarmacêutico e nutritivo (Fernandes, 2010).

Tem-se assistido a um crescente interesse no estudo das propriedades dos compostos bioativos destas plantas, mais concretamente dos benefícios que podem ter para a saúde quando aplicados a alimentos. Neste contexto, o que é efetivamente novidade e de grande interesse económico, industrial e social, é a obtenção e o estudo dos princípios ativos das ervas aromáticas e a validação



da sua eficiência quando aplicados na produção de queijos, visando padrões de qualidade e segurança alimentar mais elevados.

### **Tomilho bela-luz**

As espécies do género *Thymus* são arbustos perenes herbáceos, utilizados normalmente como especiarias e/ou plantas medicinais (Evans & Edward, 1998). O *Thymus mastichina* L. é uma planta da família *Labiatae*, endémica da Península Ibérica. Em Portugal, esta espécie encontra-se distribuída por todo o país, exceto nas regiões calcárias, e a sua época de floração ocorre entre abril e junho (Franco, 1983).

É igualmente designado por Tomilho bela-luz ou “sal puro” e caracteriza-se pela qualidade dos seus princípios ativos (Gordo *et al.*, 2012), que para além das suas vantagens culinárias, são também excelentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Fraternali *et al.*, 2003). Essas propriedades contribuem não só para melhorar as características organolépticas dos produtos alimentares onde são aplicados, mas também para aumentar o seu período de conservação. Na indústria alimentar, a utilização de antioxidantes é já uma prática comum, e tem como objetivo a prevenção ou redução das reações de oxidação nos alimentos, de forma a garantir a qualidade alimentar por períodos mais longos e aumentar o seu tempo de prateleira. Alguns desses antioxidantes sintéticos têm sido alvo de discussão, nomeadamente no que respeita à sua segurança para o consumidor, refletindo a necessidade de se encontrarem antioxidantes naturais com capacidade de os substituir (Delgado *et al.*, 2014).

Neste contexto, aliando os conhecimentos adquiridos por duas alunas ao longo do percurso académico na licenciatura em biotecnologia, à experiência de um grupo de docentes e técnicos qualificados em diversas áreas complementares, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra, foi constituída uma equipa de trabalho focada no estudo do potencial antioxidante e antimicrobiano do *Thymus mastichina* L. e da possibilidade da sua aplicação na indústria alimentar, mais concretamente no queijo curado. Pretendeu-se



desenvolver produtos naturais à base desta planta aromática, que mantivessem ou potenciasses as suas características e pudessem ser usados no aumento do valor nutricional dos alimentos, ou no combate ao desenvolvimento microbiano.

## Desenvolvimento de novos produtos à base do Tomilho bela-luz

A primeira etapa do estudo proposto passou pela produção de dois tipos de extratos de *T. mastichina* L. Submeteram-se 25 g da planta seca a processos de extração com água (decoção) ou com etanol (maceração), visando obter um extrato aquoso e um extrato etanólico, respetivamente. No caso da preparação do extrato aquoso (EA), após arrefecimento da solução procedeu-se à sua filtração sob vácuo, à liofilização do filtrado e armazenamento a -18 °C. Para o extrato etanólico (EE), a solução foi filtrada sob vácuo e armazenada nas mesmas condições.

### Capacidade antioxidante dos extratos

A capacidade antioxidante de ambos os extratos (Tabela 1) foi avaliada por dois métodos colorimétricos: o método DPPH, descrito por Sharma & Bhat (2009) e o método ABTS, baseado na técnica descrita por Miller & Rice (1997).

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos presente no extrato aquoso (EA) e no extrato etanólico (EE) de *Thymus mastichina* L. (\*, \*\*  $p < 0,001$ , quando comparados com o controlo)

Método	Extrato Aquoso (EA)	Extrato Etanólico (EE)
ABTS (IC50 $\mu\text{L mg}^{-1}$ )	16,8 $\pm$ 3,2*	24,9 $\pm$ 4,0
DPPH (IC50 $\mu\text{L mg}^{-1}$ )	38,6 $\pm$ 1,2**	81,6 $\pm$ 1,9
Fenóis totais (nmol EAG $\text{mg}^{-1}$ )	257,0 $\pm$ 23,5**	9,2 $\pm$ 3,8

Segundo esta metodologia, foi possível verificar que o extrato aquoso desta planta aromática apresenta maior capacidade antioxidante (Singleton *et al.*, 1999) que se traduz em menores valores pelos métodos ABTS e DPPH, e

maior conteúdo em compostos fenólicos do que o extrato etanólico (Tabela 1). Estes resultados permitem inferir que uma das mais-valias da introdução do extrato aquoso na indústria alimentar, será o seu contributo para o aumento do valor nutricional e da capacidade antioxidante dos alimentos.

### **Extrato aquoso como substituto do sal do queijo curado**

A denominação empírica de “sal puro” atribuída a esta planta, reflete o seu carácter de intensificador de sabor quando aplicado a alimentos. Neste sentido, a possibilidade da redução do teor de sal usado na confeção de produtos alimentares pelo recurso ao extrato aquoso do Tomilho bela-luz, revelou-se um desafio extremamente interessante e promissor, não só pela diminuição do conteúdo de NaCl, como também pelo aumento do valor nutricional do alimento.

O queijo curado é um alimento, que em geral, tem uma concentração de sal relativamente elevada, e por consequência a população que sofre de problemas de hipertensão arterial vê-se limitada às possibilidades do seu consumo.

A influência da aplicação de extratos de Tomilho bela-luz em queijo curado, não tinha sido até aqui estudada, não permitindo prever quais as alterações físico-químicas, nutricionais, e sobretudo organolépticas que ocorreriam no produto. Neste sentido, foi necessário planear e desenvolver ensaios à escala semi-industrial com o intuito de avaliar as características do coadjuvante proposto como antioxidante natural e substituto do sal usado no fabrico de queijo, quando aplicado diretamente na coalhada.

Este estudo consistiu na confeção e comparação de queijos curados produzidos com extrato aquoso (0,15% m/m) e queijos com formulação denominada como tradicional. Avaliou-se em paralelo o processo de salga em salmoura, ou salga por espalhamento de sal à superfície, resultando no final quatro variedades de queijo: queijo com extrato aquoso com salga à superfície (EA.S); queijo com extrato aquoso em salmoura (EA.SM); queijo tradicional com salga à superfície



(T.S) e o queijo tradicional em salmoura (T.SM).

Os queijos curados de vaca (120 g) foram produzidos na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) e usados como modelos para aplicação do extrato aquoso de Tomilho. O leite de vaca pasteurizado foi normalizado a  $3,5 \pm 0,1\%$  de gordura. Após coagulação, a coalhada foi cortada com liras e realizou-se um prévio dessoramento da massa. Nesta fase, diluiu-se o extrato aquoso de Tomilho num pequeno volume de água, sendo de seguida adicionado a metade da massa e homogeneizado. Esta, por sua vez continuou o dessoramento em moldes plásticos durante 24 h, numa câmara refrigerada. No dia seguinte, um lote de queijos foi desenformado e colocado em salmoura (com 19 °Baumé) durante 10 min (metade do tempo requerido para o tamanho do queijo em questão) de forma a tentar reduzir até 50% do sal presente no produto final. Num lote distinto, a salga dos restantes queijos foi efetuada pelo espalhamento de sal à superfície, controlando a sua quantidade de forma a reduzir novamente 50% do sal presente no produto final. Nos queijos com formulação tradicional, a salga em salmoura e por espalhamento à superfície foram realizadas de acordo com o tempo em salmoura e percentagem de sal totais. Após confeção, todos os queijos sofreram um processo de cura de 45 dias.

### **Avaliação nutricional e físico-química dos queijos**

A avaliação das características nutricionais dos queijos decorreu no final do processo de cura e consistiu na quantificação da humidade, humidade isenta de gordura (HIG), teor de gordura e teor de sal, (Figura 1a-c). As características físico-químicas avaliadas foram a textura (Figura 1d), pH, acidez titulável, cor (Tabela 2) e a atividade da água ( $a_w$ ).

Analisando o gráfico da Figura 1a) é possível verificar que de um modo geral, o método de salga não influenciou a percentagem de humidade nos queijos. As amostras com EA apresentaram valores de humidade e humidade isenta de gordura (HIG) ligeiramente menores, especialmente para o caso da variedade EA.SM. Estes queijos, onde se associa a adição de extrato aquoso de Tomilho

com o método de salga por salmoura, serão à partida um produto mais duro e consequentemente menos amanteigado, comparativamente com os exemplares produzidos de acordo com a formulação convencional.

A quantidade de água retida na massa constitui também um fator importante no processo de cura, no sabor e aroma do queijo bem como na sua conservação, já que, quanto maior o teor de humidade, mais rápida será a proteólise. Neste caso, todos os queijos podem ser classificados em termos de consistência como queijos de pasta semi-mole uma vez que apresentam valores de HIG entre 61 e 69% (NP 1598).

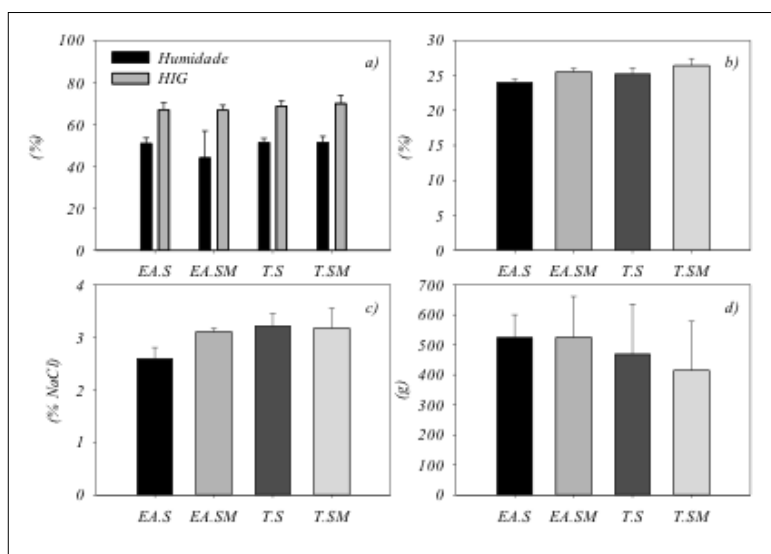


Figura 1. Composição e textura dos queijos após 45 dias de cura ( $9,2 \pm 0,58$  °C e  $92,4 \pm 3,1$ % HR): a) humidade e humidade isenta de gordura (HIG) (%); b) gordura (%); c) cloretos (% NaCl) e d) dureza (g).

Relativamente ao teor de gordura (Figura 1b) verifica-se que, o método de salga é o fator que mais influência exerce. No entanto, a presença de EA de Tomilho também provoca uma diminuição no teor de gordura nos queijos, o que pode indicar que a concentração de NaCl afeta a composição físico-química dos

mesmos. Neste caso concreto, o espalhamento de sal à superfície e a utilização de EA permitem obter queijos com menos 2% de matéria gorda. Deste modo, a salga por salmoura apresenta-se como mais eficiente na remoção de humidade do interior do queijo, obtendo-se um produto final mais denso.

A percentagem de sal (NaCl) dos queijos (Figura 1c) foi inferida através da quantificação de cloretos presentes nas amostras. É possível verificar que os queijos produzidos pela metodologia tradicional apresentam percentagens de sódio semelhantes ( $\approx 3,2\%$ ). Isto comprova que independentemente do método de salga utilizado, os queijos adquirem uma concentração de sal semelhante. Verifica-se também que a utilização do redutor de sal permite diminuir essa concentração, especialmente quando é aplicado o método de salga por espalhamento à superfície. Neste caso, regista-se uma redução de aproximadamente 12,5% do teor de sal nos queijos EA.S, em comparação com as amostras sujeitas à salmoura (EA.SM). Quando se recorre ao método de salmoura, e apesar de se ter reduzido o tempo previsto para metade do que seria aplicado na salmoura tradicional (T.SM), nas amostras EA.SM praticamente não se verifica uma redução no teor de sal dos queijos. Neste caso, é possível deduzir que a transferência do sal da salmoura para o queijo acontece principalmente nos primeiros minutos de contacto, possivelmente devido à pequena dimensão dos queijos testados e à elevada concentração da salmoura inicial (19 °B). Desta forma, seria recomendada a diminuição dessa concentração inicial e simultaneamente a redução do tempo de salga.

De forma a determinar dureza dos queijos, realizou-se a análise do perfil de textura (em inglês TPA) através do texturómetro *Stable Micro Systems Texture Analyzer*. O tratamento dos resultados foi realizado pelo *Specific Expression PC Software*. A Figura 1d) mostra que não existem diferenças significativas na dureza dos queijos com EA, independentemente do método de salga praticado, e que estes apresentam os valores mais elevados de entre os tipos de queijo produzidos. Isto pode ser explicado pelo seu maior grau de dessoramento e humidade ligeiramente inferior. Já os queijos tradicionais (T.S e T.SM) mostram diferenças entre si, dado que a salga realizada por espalhamento permite a obtenção de

um produto final com casca mais rígida devido à maior concentração de sal à superfície e à sua secagem mais intensa.

Na Tabela 2 apresentam-se os resultados da acidez titulável e do pH dos queijos. Verifica-se que os queijos com extrato aquoso apresentam uma acidez titulável intermédia comparativamente aos queijos produzidos de forma tradicional. Isto demonstra que a incorporação direta do extrato aquoso na coalhada não penaliza a atividade das culturas bacterianas utilizadas no fabrico do queijo. Tendo em conta que estas culturas são responsáveis pelo metabolismo da lactose em ácido láctico, explica-se o aumento da acidez e consequentemente redução do pH ao longo do tempo de cura. Outro aspeto interessante, reside no facto da presença de EA aparentar regular a acidez dos queijos, podendo de alguma forma condicionar o metabolismo celular na produção de ácido.

Tabela 2. *Acidez titulável (% ácido láctico), pH e cor ( $L^*a^*b^*$  e  $\Delta E^*$ ) dos queijos após 45 dias de cura ( $9,2 \pm 0,58$  °C e  $92,4 \pm 3,1$  % HR)*

Queijo	Acidez Titulável	pH	Cor			
			$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
EA.S	0,46±0,01	5,40±0,24	70,3±10,98	6,57±6,29	14,54±1,85	28,47±10,56
EA.SM	0,48±0,14	5,52±0,20	75,58±10,21	3,19±4,79	15,32±3,89	23,49±10,18
T.S	0,30±0,02	5,68±0,33	76,54±10,15	-0,10±3,58	2,14±2,43	23,54±10,63
T.SM	0,64±0,14	5,46±0,22	81,51±9,95	-10,55±5,03	9,112±1,50	23,15±9,97

A cor dos queijos (Tabela 2) foi avaliada pelo sistema Hunter CIEL\* $a^*b^*$ , em termos de coordenadas individuais e pelo diferencial de cor ( $\Delta E^*$ ) com o colorímetro HP-2132, *Zhejiang Top Instruments Co*, previamente calibrado com uma placa padrão amarela ( $L^*_p = 98,9$ ;  $a^*_p = -2,5$  e  $b^*_p = 5,6$ ). Foi possível observar que a cor dos queijos produzidos não é homogénea, o que é demonstrado pela grande dispersão nos resultados obtidos para cada coordenada.

Passados 45 dias de cura, a luminosidade média ( $L^*$ ) dos queijos com EA de Tomilho é ligeiramente inferior. Contudo, a influência da utilização do extrato na cor do produto final é mais evidente analisando as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ .

As amostras EA.S e EA.SM apresentaram valores de  $a^*$  positivos (direção do vermelho) e mais afastados do valor  $a^*$  do padrão. Em relação à coordenada  $b^*$ , os valores positivos mais elevados confirmam que o extrato aquoso confere ao queijo uma cor amarela mais intensa. Em termos de variação global da cor ( $\Delta E^*$ ) o queijo com aplicação do extrato aquoso e sujeito ao processo de salga à superfície (EA.S) é o que se afasta mais do padrão amarelo.

A atividade da água ( $a_w$ ) foi determinada para a pasta e casca dos queijos sujeitos à salga por salmoura, com e sem extrato aquoso (EA.SM e T.SM). Este parâmetro está intimamente relacionado com a humidade do alimento, permitindo determinar a sua capacidade de conservação e de propagação microbiana. Com base nos resultados obtidos depreende-se que a adição do redutor de sal na coalhada e consecutiva redução do período de salmoura, não origina qualquer alteração na  $a_w$  do produto final (casca e pasta) dadas as semelhanças com o queijo tradicional. Para ambos os casos, os valores da  $a_w$  obtidos são típicos destes produtos, variando entre 0,85 e 0,9.

### **Análise sensorial aos queijos**

As provas sensoriais dos queijos foram realizadas com um painel de provadores não treinado, com o intuito de avaliar a perceção do consumidor em geral. Ou seja, avaliou-se a capacidade de diferenciação dos produtos com extrato aquoso de Tomilho bela-luz, face aos queijos com formulação tradicional. Para tal, os provadores efetuaram provas triangulares, nas quais lhes foi solicitada a identificação da amostra diferente de entre as três apresentadas (2 iguais e uma diferente), e ainda a identificação da amostra da sua preferência. Dos 21 provadores, apenas 47,6% conseguiu identificar corretamente a amostra diferente, bem como, 57,1% deu preferência à formulação com extrato aquoso de Tomilho relativamente à do queijo tradicional. Face a estes resultados, é possível concluir que não existiu uma diferenciação estatisticamente significativa entre os dois tipos de queijo, e que a apreciação positiva dos queijos com o novo produto valida a sua aplicação e possível utilização durante o fabrico.

O extrato aquoso de Tomilho bela-luz aplicado na confeção de alimentos atua como um intensificador de sabor, enaltecendo o sabor dos alimentos e assim potenciando a redução da quantidade de sódio adicionada. Esta propriedade permitirá que os produtos apresentem um valor nutricional acrescentado devido às propriedades antioxidantes do extrato em questão, além de apresentarem benefícios para a população que sofre de problemas de hipertensão e que se vê sujeita às limitações de consumo de um alargado leque de produtos.

### **Potencialidades e limitações do redutor de sal**

São inúmeros os benefícios da utilização do extrato aquoso liofilizado de Tomilho bela-luz na confeção de queijo curado. Vão desde a valorização de uma planta aromática autóctone, à possibilidade da produção de queijos com menor teor de sal, maior valor nutricional, e com características físico-químicas semelhantes ou melhoradas comparativamente aos queijos de confeção tradicional. No presente estudo o queijo curado foi utilizado como veículo experimental. No entanto, existem inúmeras áreas alimentares que poderão usufruir das propriedades do EA, por exemplo os preparados cárneos e a confeção de pratos, são alguns exemplos da versatilidade e potencial deste produto.

No entanto, no decorrer deste estudo foram identificadas algumas potenciais dificuldades relativamente ao *scale-up* do processo para a indústria. Um dos problemas encontrados foi a necessidade de evitar perdas do produto durante o processo produtivo dos queijos e, por isso este ter de ser aplicado manualmente à coalhada após separação do soro. Isto porque, como o EA é solúvel em água, e por isso no soro, a sua adição antes do dessoramento proporcionaria a sua perda durante esta operação. A nível industrial esta alteração teria que ser equacionada com a possibilidade de alterações no próprio processo/equipamento. Outra questão está relacionada com o preço final do produto, uma vez que o processo de liofilização é relativamente dispendioso e o rendimento de extração dos compostos ativos é reduzido (19,97%). Neste sentido uma análise económica



aos custos de produção será fundamental.

### **Extrato etanólico como antimicrobiano natural na substituição de fármacos no controlo microbiano do queijo curado**

Na produção industrial de queijo é comum o uso da natamicina durante o processo de cura, para limitar o desenvolvimento microbiano e consequentes perdas na produção. Embora seja considerado um composto GRAS (*Generally Recognized As Safe*), quando aplicado em quantidades excessivas pode conduzir a problemas de segurança alimentar (Rencüzoğullari *et al.*, 2009). Devido a este facto é comum uma maior exigência quanto ao uso deste antimicótico, que se reflete em limitações na exportação de queijo curado que não respeitem limites exigidos pelos países que os importam. Por outro lado, na produção de queijos curados com denominação de origem protegida (DOP), o impedimento legal do uso de produtos sintéticos e consequente desenvolvimento microbiano conduz a perdas de produção avultadas.

Com o intuito de vir a substituir a aplicação de fármacos durante o período de maturação do queijo e de encontrar uma alternativa natural para utilização nos produtos DOP avaliou-se o poder antimicrobiano do extrato etanólico.

### **Eficiência antimicrobiana *in vitro* e *in vivo***

Após recolha e isolamento dos fungos mais comuns nas câmaras de cura e, que proliferam à superfície do queijo curado de origem bovina, realizaram-se testes *in vitro* e *in vivo* onde o crescimento microbiano foi monitorizado ao longo do tempo, de forma a analisar a eficiência do extrato etanólico (EE) de Tomilho bela-luz.

Os fungos isolados para os testes *in vitro* foram o *Mucor* s.p. e o *Penicillium* s.p. Estes testes consistiram na avaliação da performance de inibição do extrato etanólico (EE), da natamicina (CP - controlo positivo) e a sua comparação com o controlo negativo (CN), isto é, sem qualquer inibidor.

Analisando o desenvolvimento microbiano em termos do diâmetro do halo para cada estirpe, quer graficamente (Figura 2) quer em placa de Petri (Figura 3) os resultados obtidos demonstraram uma óbvia diminuição no halo de crescimento dos fungos testados quando expostos ao extrato etanólico de Tomilho, comparativamente ao controlo negativo e à natamicina (antibiótico comercial).

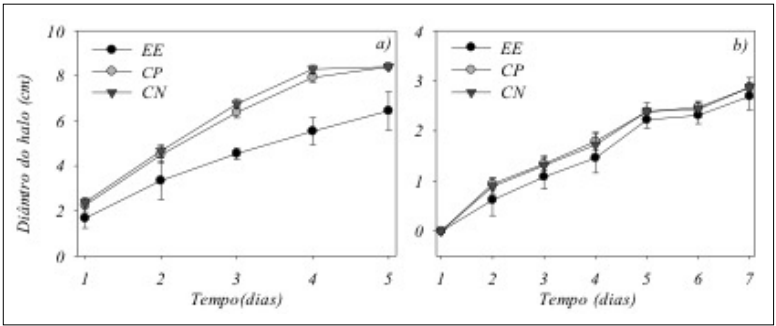


Figura 2. Evolução do diâmetro do halo de crescimento de colónias de: a) *Mucor* sp. e b) *Penicillium* sp., na presença de extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).

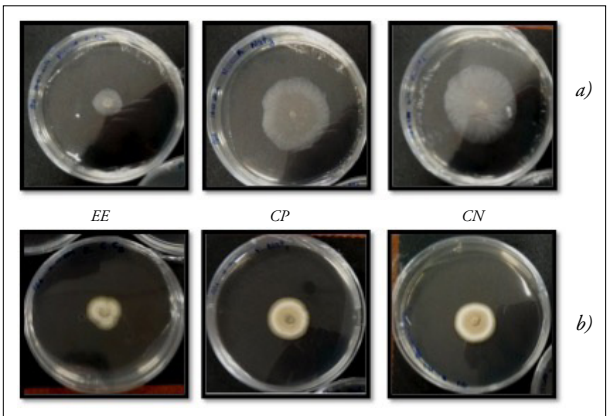


Figura 3. Diâmetro do halo de crescimento de colónias de: a) *Mucor* sp. ao fim de 2 dias e b) *Penicillium* sp. ao fim de 4 dias, na presença de extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).



Pode-se também observar a diminuição da eficiência da natamicina ao longo do tempo e, os resultados obtidos para este caso aproximam-se dos do controlo negativo. Estas observações permitem equacionar que o extrato etanólico de *T. mastichina* L. é um potencial substituto para os antibióticos tipicamente utilizados no fabrico industrial de queijo curado, podendo também ser usado durante a produção dos queijos de denominação de origem protegida.

De forma a comprovar os resultados obtidos em ambiente controlado de laboratório, procedeu-se à realização de testes *in vivo* (Figura 4) usando queijos curados de origem bovina. Neste caso procedeu-se à aplicação direta dos produtos sobre os queijos produzidos com leite cru, os quais foram submetidos às condições normais de maturação na câmara de cura (aproximadamente 11 °C e humidade relativa de 85%). Nestas condições, foi possível demonstrar e confirmar que, numa situação real de produção, o EE apresenta uma eficiência semelhante ou superior à natamicina, diminuindo efetivamente o desenvolvimento de fungos no queijo curado.

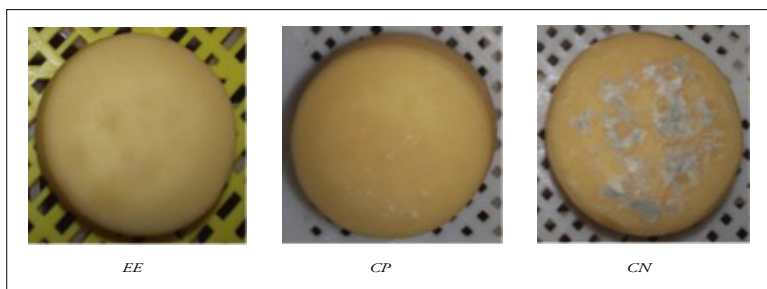


Figura 4. Desenvolvimento de bolores e leveduras à superfície do queijo de origem bovina durante o processo de cura, 8 dias após aplicação do extrato etanólico (EE), natamicina (CP) e sem inibidor (CN).

### Performance sobre a microbiota dos queijos

A análise do desenvolvimento da flora microbiana foi efetuada para avaliar se os efeitos do EE podem garantir os parâmetros de qualidade dos queijos curados e, comprovar os resultados dos estudos anteriores. Esta análise foi feita

comparando a evolução dos principais grupos de microrganismos patogénicos ou contaminantes em queijos tratados com EE e com natamicina.

Os ensaios aos queijos realizaram-se aos dias 1, 8, 16, 24 e 40 após tratamento com cada um dos produtos, e consistiram na recolha de amostras da superfície do queijo (10 g), em triplicado, para quantificação de *Staphylococcus* spp. (em meio *Baird-Parker Agar Base*), *Pseudomonas* spp. (em meio *Pseudomonas Agar F*, PAF), *Enterobacteriaceae* (em meio *Violet Red Bile Glucose Agar*, VRBGA) e determinação de bolores e leveduras (em meio *Potato Dextrose Agar*, PDA). O procedimento utilizado baseou-se no efetuado por Ramos *et al.*, (2012).

A Figura 5 permite concluir que de um modo geral, o extrato etanólico apresenta resultados semelhantes ou melhores do que a natamicina. Para o caso dos *Staphylococcus* spp. os resultados obtidos, quer para o EE quer para a natamicina, apresentaram uma evolução semelhante durante o período de maturação, atingindo valores praticamente nulos no final desse período. Quanto às *Enterobacteriaceae*, verificou-se um crescimento exponencial nos primeiros 16 dias, contudo, após este período o  $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$  diminui 3 ordens de magnitude para os queijos tratados com natamicina e tende para zero na presença de extrato etanólico. Este facto poderá ser explicado pelo aumento da competição microbiana das espécies que apresentam maior aptidão replicativa face às condições a que estão sujeitas. Relativamente às *Pseudomonas* spp., fungos e leveduras, todos apresentam um padrão de crescimento semelhante. Nos primeiros 16 dias de maturação observaram-se contagens superiores para o caso do tratamento com EE, no entanto, verifica-se uma inversão desta tendência até ao final do período de maturação. Esta diminuição varia entre uma a duas ordens de magnitude.

Nas amostras de queijo curado sem tratamento (dados não apresentados), tal como esperado, verificou-se um desenvolvimento microbiano mais acentuado praticamente para todos os substratos estudados. Apesar de todos os queijos apresentarem contagens semelhantes no início da maturação, no caso dos queijos sem tratamento há um aumento significativo de microrganismos nos

últimos dias de cura. Por sua vez os queijos que receberam o tratamento com extrato etanólico mostraram as menores contagens no final do período de maturação.

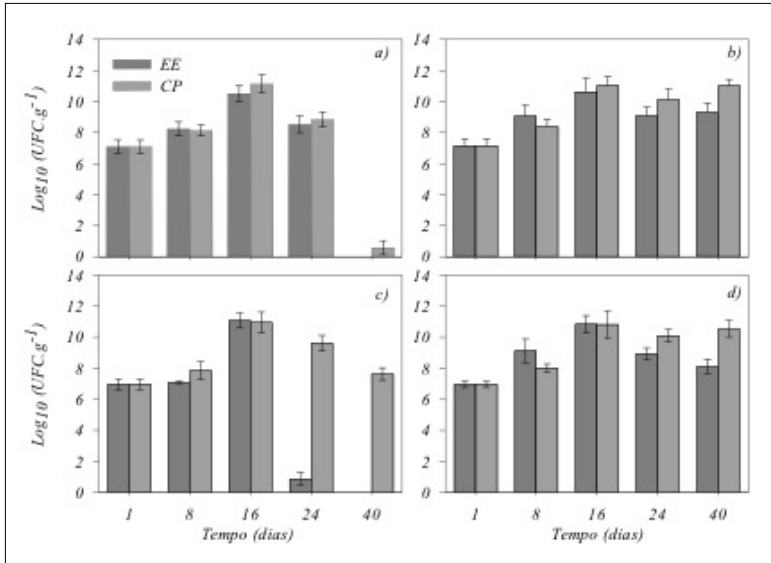


Figura 5. Contagens de: a) *Staphylococcus* spp., b) *Pseudomonas* spp., c) *Enterobacteriaceae* e d) bolores e leveduras ( $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ ) em queijos tratados com extrato etanólico (EE) e natamicina (CP) durante a maturação.

A aplicação do extrato etanólico na produção de queijo curado, tanto em modo tradicional como em modo de produção biológica, permite obter um produto final isento de fármacos, facto que para o consumidor representa uma maior segurança alimentar e ainda a redução da probabilidade de desenvolvimento de resistência a antibióticos e, paralelamente garante ao produtor um produto com maior valor acrescentado, tornando-o competitivo face à concorrência.

### Eficiência como agente fumigador em câmaras de cura

Com o intuito de conferir ao produto um leque de aplicações mais vasto, testou-se a sua eficácia como agente fumigador/nebulizador das câmaras de cura e

analisou-se a carga microbiana presente nesta atmosfera antes e após aplicação do extrato etanólico (1 h, 2 e 4 dias) (Abelho, 2012). Os resultados obtidos, apresentados na Figura 6, dizem respeito à contagem de microrganismos totais em meio PCA (*Plate Count Agar*) e contagem de bolores e leveduras em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*).

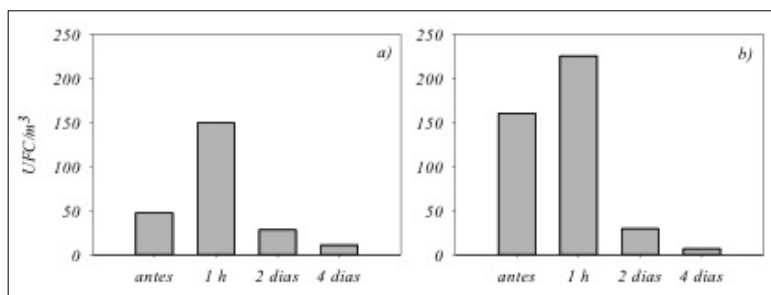


Figura 6. Contagens de: a) microrganismos totais, b) bolores e leveduras (UFC/m<sup>3</sup>) do ar da câmara de maturação antes e depois da fumigação: 1 h, 2 dias e 4 dias.

A evolução da contaminação microbiana no ar da câmara de cura (Figura 6) é semelhante para as contagens de microrganismos totais e bolores e leveduras. Antes do processo de fumigação verificaram-se contagens de 47 e 160 UFC/m<sup>3</sup> para o primeiro e segundo caso, respetivamente. Ao fim de 1 hora, a contagem de ambas as categorias de microrganismos atinge um valor máximo, mas decai exponencialmente ao fim de 2 e 4 dias, registando valores inferiores às contagens antes da pulverização com o extrato etanólico. A tendência geral após a fumigação, foi a redução significativa do desenvolvimento microbiano até ao quarto dia da experiência. O facto de ao fim de 1 h se terem registado valores superiores aos observados antes da aplicação do EE, poderá ser explicado pelo método de amostragem, uma vez que esta foi feita por sedimentação dos microrganismos presentes no ar interior da câmara. Assim, nas horas subsequentes à nebulização ocorreu um aumento da sedimentação dos microrganismos presentes no ar e, consequentemente o aumento das contagens microbianas. Estas observações permitem também inferir que não é aconselhável a colocação dos queijos na câmara de cura pouco tempo após a realização da fumigação (1-2 h), sob pena

da carga microbiana depositada nos queijos ser ainda maior, apesar do efeito antimicrobiano do extrato. Verificou-se ainda uma atuação mais vincada do extrato na redução dos bolores e leveduras presentes no ar da câmara de maturação, indicando uma maior especificidade para este grupo.

O extrato etanólico de Tomilho bela-luz, caracterizado pelas suas propriedades antimicrobianas, apresenta ainda capacidade de desinfecção de diversas superfícies que estejam em contacto com alimentos, por exemplo bancadas de manipulação, utensílios de preparação de alimentos ou até mesmo os próprios produtos alimentares e/ou as suas embalagens.

### **Potencialidades e limitações do extrato etanólico**

Durante os estudos realizados, pode concluir-se que o extrato etanólico de Tomilho bela-luz poderá ser uma mais-valia para a indústria queijeira, pois apresenta resultados bastante promissores. A sua performance como agente microbiológico aproxima-se, e por vezes supera, o poder antimicrobiano da natamicina contra algumas estirpes específicas de microrganismos. Desta forma, os produtores em geral poderão usufruir dos benefícios de um produto natural e biológico, que pode ser utilizado diretamente no queijo ou como agente de fumigação em câmaras de cura. Contudo, uma das principais dificuldades está associada à sua aprovação como novo aditivo alimentar, nomeadamente, no que concerne à determinação das concentrações máximas permitidas. Estes processos são normalmente morosos e dispendiosos, implicando a realização de testes de toxicidade *in vivo*, o que se poderá traduzir num longo período até que o produto tenha a validação dos requisitos legais indispensáveis para comercialização.

### **Reconhecimento do interesse científico e tecnológico da investigação**

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado anteriormente foi submetido a vários concursos dedicados à inovação tecnológica, ideias de

negócio, empreendedorismo e de produtos inovadores relacionados com a alimentação ou alimentos. Da participação nestes concursos (Tabela 3) tem resultado o reconhecimento do interesse tecnológico deste tema, uma vez que os trabalhos propostos chegaram à fase final arrecadando vários prémios e menções honrosas.

Tabela 3. *Prémios e distinções obtidos pela equipa e comunicações científicas realizadas no âmbito da investigação*

Data	Evento	Comunicação/ Prémio/ Distinção	Tema / Projeto
1 Nov 2013	Concurso: Passaporte para o Empreendedorismo Programa estratégico para o Empreendedorismo e Inovação	Duas bolsas de investigação de 12 meses	Projeto nº 1007 - Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo: os benefícios da redução do teor de sal e eliminação de produtos químicos durante o processo de cura.
27 Nov 2013	IV Conferência CEF 2013, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra	Comunicação em formato de poster	<i>Thymus mastichina L.</i> profits to dairy industry: potential antimicrobial and antioxidant activity.
23 Dez 2013	Concurso: Smart Rural Ideia Challenge 2013 Empreendedorismo de Base Rural	2º Prémio. Categoria: inovação tecnológica	<i>MAP 4 Cheese</i> - Produção de coadjuvantes/ingredientes naturais para aplicação na indústria alimentar (ou em queijarias).
10 Fev 2014	Concurso: Ideias de Negócio ARRISCA-C 2013	Prémios MoviPoc e IDDNET-Technology Network. Categoria: ideias de negócio	Produção de coadjuvantes/ ingredientes naturais para aplicação na produção de queijos
19 Fev 2014	Workshop Produtos Naturais: aplicações (bio)tecnológicas, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária (ESAC)	Comunicação oral	Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo.
27 Set 2014	Concurso: 11ª Edição do Concurso Regional de Empreendedorismo - Construir Futuros na região de Coimbra, Poliemprende 2014	Um dos cinco finalistas do concurso	Produção de revestimentos de origem natural para aplicação em queijos curados
16 Out 2014	Concurso: Food & Nutrition Awards	3ª Menção Honrosa. Categoria: investigação & desenvolvimento	ReduzSal - Substituto à base de tomilho bela-luz que permite reduzir o sal usado no queijo curado
17-20 Dez 2014	XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society (SPB), Coimbra	Comunicação em formato de poster	<i>Thymus mastichina L.</i> as substitute of synthetic antibiotics in dairy industry.
27 Mar 2015	I Concurso InovCluster de produtos alimentares inovadores	2º Prémio	Queijo de ovelha curado com incorporação de Tomilho bela-luz
23 Mai 2015	Concurso DISRU.PT Summit	Vencedor do concurso DISRU.PT Startup Pitch	<i>MAP4Cheese</i> - Antimicrobianos de origem natural para queijo curado



Já entre a comunidade científica, a seleção do trabalho desenvolvido para apresentações orais (Carvalho *et al.*, 2014) ou em formato de poster em congressos nacionais (Carvalho *et al.*, 2013), internacionais (Ferreira *et al.*, 2014) e *workshops* (Tabela 3) evidencia a inovação deste tema e o seu interesse científico.

Não menos importante será salientar que o financiamento para a investigação é fundamental, quer em termos de recursos humanos quer em recursos materiais. Este trabalho teve como grande impulsionador, duas bolsas de 12 meses recebidas no âmbito do Concurso Passaporte para o Empreendedorismo inserido no Programa Estratégico para o Empreendedorismo e a Inovação (+e+i) aberto à sociedade civil. Este programa, de acordo com o Impulso Jovem, pretende estimular jovens empreendedores qualificados a desenvolverem o seu projeto de empreendedorismo inovador, que se encontre em fase de ideia, facultando um conjunto de ferramentas técnicas e financeiras.

## **Conclusão**

A investigação aqui apresentada e os resultados obtidos são extremamente promissores e demonstram grande potencialidade na utilização de dois produtos à base do Tomilho bela-luz para aplicação na indústria alimentar: o extrato aquoso, como substituto do sal nos alimentos e o extrato etanólico como substituto dos fármacos usados no controlo microbiano.

A utilização do extrato aquoso na confeção de queijo curado permitiu a redução de 12,5% de sal no produto final, sem afetar os parâmetros físico-químicos e nutricionais das amostras produzidas face às de confeção convencional. A análise sensorial demonstrou que os provadores não conseguem identificar os queijos com aplicação de EA, dando preferência a este produto, usando a justificação de se tratar de um queijo com um sabor mais intenso.

O comportamento antimicrobiano do extrato etanólico de Tomilho bela-luz comprova a sua utilidade no controlo do crescimento de fungos e leveduras

durante o processo de maturação de queijo curado, tomando uma posição competitiva face ao antibiótico convencional.

Para além das vantagens inúmeradas anteriormente, podemos destacar ainda que a utilização destes produtos contribui para o enriquecimento nutricional, em antioxidantes e óleos essenciais, dos alimentos onde podem ser aplicados. Contudo, estudos posteriores de caracterização química e toxicológica serão necessários de forma a validar a eficiência destes produtos à escala industrial, otimização e aperfeiçoamento da tecnologia para o seu *scale-up* e ainda o estudo de viabilidade económica do processo.

Devido à sua origem natural, e às suas propriedades específicas, os extratos de Tomilho bela-luz constituem uma importante alternativa para o futuro da indústria de lacticínios, bem como da indústria alimentar, em geral. No entanto, não é expectável que se verifique uma completa substituição dos produtos tradicionalmente utilizados, uma vez que existirão diferenças de custo, aplicabilidade e também devido à comodidade que existe, para já, na utilização dos produtos mais habituais.



## Referências

- Abelho, M. (2012). Parte 2. Qualidade microbiológica do ar e de superfícies. In Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental. Escola Superior Agrária Coimbra, Instituto Politécnico Coimbra, Portugal. pp 25. Retrieved from [http://www.esac.pt/Abelho/Monitor\\_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf](http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf)
- Carvalho, FC., Gomes, D., Abreu, H., Oliveira, MM. & Ferreira, FML. (2013). *Thymus mastichina* L. profits to dairy industry: potential antimicrobial and antioxidant activity. IV Conferência CEF 2013, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 27 Novembro.
- Carvalho, FC., Rodrigues A, Oliveira A, Abreu H, Oliveira MM, Pereira CD, Gomes D, Henriques MHF. & Fernanda F. (2014). Aplicação do tomilho bela-luz na produção biológica de queijo. Workshop Produtos Naturais: aplicações (bio)tecnológicas, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária (ESAC). Coimbra, 19 Fevereiro.
- Delgado, T., Marinero, P., Manzanera, MC., Asensio, C., Herrero, B., Pereira JA. & Ramalhosa, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (1), 412-418. doi:10.1016/j.lwt.2013.12.041
- Evans, WC. & Edward, TG. (1989). *Trease and Evans Pharmacognosy*. London: Baillière Tindall.
- Fernandes, A. (2010). Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. Retrieved from <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/2593>
- Ferreira, FM., Rodrigues, AS., Carvalho, F., Oliveira, MM., Pereira, CD., Dias, SP, Gomes, D. & Henriques, MHF. (2014). *Thymus mastichina* L. as substitute of synthetic antibiotics in dairy industry. XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society (SPB), Coimbra – Portugal, 17-20 December.



- Franco, JA. (1983). Botânica das labiadas Portuguesas e suas potencialidades. In Primeiras Jornadas Nacionais de Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais. Coimbra: LNETI.
- Fraternal, LD., Giamperi, L. & Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina*. *Journal of Essential Oil Research*, 15 (4), 278-281. doi:10.1080/10412905.2003.9712142
- Gordo, J., Máximo, P., Cabrita, E., Lourenço, A., Oliva, A., Almeida, J., Filipe, M., Cruz, P., Barcia, R., Santos, M. & Cruz, H. (2012), *Thymus mastichina*: chemical constituents and their anti-cancer activity. *Natural Product Communications*, 7 (11), 1491-1494.
- Miller, NJ. & Rice-Evans, CA. (2012). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*, 26 (3), 195-199. doi:10.3109/10715769709097799
- NP 1598 (1983). Queijo. Definição, classificação, acondicionamento e marcação. 2ª Ed., Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- Ramos, O., Fernandes, JF, Silva, SI., Pintado, ME. & Malcata, FX. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (6), 533-552. doi: 10.1080/10408398.2010.500528
- Rencüzoğullari, E., Azirak, S., Canimoglu, S., Parlak S., & Buyukleyla, M. (2009). Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 32 (1), 47-52. doi:10.1080/01480540802431371
- Singleton, V.L, Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sharma, OP., & Bhat, TK. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113 (4), 1202-1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008



