

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Eficácia de um filme ativo na oxidação lipídica de alimentos  
com alto teor de gordura**

Frederico Vicente Ribeiro de Castro

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Mestre Fernanda Vilarinho  
Professora Doutora Deodália Dias

2018

As referências bibliográficas apresentadas nesta dissertação encontram-se de acordo com as *guidelines* da revista *Journal of Food Science and Technology*.

Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do autor. Com a exceção das indicadas, todas as figuras, esquemas, gráficos e tabelas presentes neste trabalho são da autoria do autor.

*Aos meus pais e irmã.*

*They may even take our lives, but they'll never take our freedom!*  
William Wallace, "Braveheart"

## Agradecimentos

Quando dou por mim a escrever a primeira e única porção desta dissertação que não envolve correções no texto, frases ou palavras, de qualquer pessoa senão a minha, estando livre para errar e errar, estou no céu. Por mais estranho que pareça, quando estou desacompanhado é quando me sinto mais calmo, pois não tenho a pressão das consequências inerentes ao não saber, ao não parecer, ao não sentir. É como existir sem ninguém ver.

Uma história costuma ter personagens, uma jornada a percorrer, uma casa no cimo de uma colina e uma estrela, no final, onde tudo acaba bem. Esta não é diferente.

Imagina um jovem, uma criança, com as suas crenças e determinações, com a sua fértil imaginação e um sonho nas mãos. No nosso mundo da infância podemos fazer sempre o que quisermos: andar só de avião, comer todos os chocolates, cantar todas as músicas, brincar com todas as crianças. Até notarmos que não o somos mais. Até termos o primeiro contato com o mundo dos crescidos. Mundo esse que me vou para sempre arrependido de ter desejado. Agora que cá estou, apenas quero que volte o mundo onde ser, era fácil. “É a vida!” – dizem os velhinhos do autocarro.

Eu hoje venho falar-vos de um rapaz que passou um ano a crescer.

A terra das maravilhas e a terra dos grandes têm uma fronteira, onde ele conheceu uma senhora. De olhar muito sério e responsável, sempre vestida de branco, ela fazia-lhe lembrar a mãe. E como tal, foi para ele uma fonte de muitos ensinamentos, muita cultura e sabedoria (Sabes como a tua mãe olha por ti? É mais ou menos isso.). Mas a maior lição que este rapazito, o Francisco, aprendeu, foi que não há mesmo problema em errar. Pois de todas as vezes que ele partiu um jarro de flores com uma bola, ela, que era como sua professora, aconselhava-o com um sorriso, a não desistir. “Não fiques triste, não te sintas frustrado”. Dizia-lhe para continuar a tentar, que um dia iria conseguir jogar dentro de casa, sem medo de partir nada. E apesar do miúdo ter aprendido muitas coisas com a senhora, foi este o momento em que ele realmente começou a crescer.

Reconhecer que tinha muito trabalho pela frente foi o primeiro passo para melhorar.

Sabemos então que nesta aventura o rapaz teve um quarto, brinquedos frágeis, e jogos para brincar. Mas os pertences eram de uma rapariga, um pouco mais velha e um pouco mais baixa que ele. Discutiam de dois em dois minutos, sobre tudo. Ela dizia coisas feias ao garoto, que então percebeu que esta menina, Mariana, não falava com as palavras. Quando ele se esquecia das regras de um dos jogos, ela ralhava que ele era pouco concentrado, mas no dia seguinte deixava na sua secretária as regras de instrução para o jogo, de forma a ele não se perder. Enquanto o jovem aprendia a ler e escrever, ela gozava. Até com calor ele ficava, mas bem que reparava nos seus olhos orgulhosos quando uma frase lhe saía bem, uma entre muitas. Quando ele se atrasava e tinha de sair de casa à pressa para ir jogar à bola, ela ajudava-o. “Nós somos uma boa equipa!” - dizia ele para não agradecer com todas as letras.

É verdade, há pessoas que comunicam com as ações, e que fazem poemas lindos sem dizer ou escrever mesmo uma letra. Assim é a sua irmã mais velha, que pode gritar, puxar orelhas e não ter morrido de amor por ele ao princípio, mas gosta dele pela pessoa que é, e terá saudades de cantar com ele.

Sempre que o Francisco e a sua irmã se zangavam, o que acontecia muitas vezes, havia uma rapariga que os acalmava. Ela era muito compreensiva e até às vezes o ajudava com a escrita, sem a irmã saber. A rapariga foi importante pois sempre que a irmã mais velha queria castigar o menino, ela exercia a sua presença a favor dele, protegendo-o. Ele nunca agradeceu pela proteção, mas ela sabia da sua gratidão. Durante toda a história, havia uma outra criança, uma vizinha. O rapaz parecia estar descontraído, mas a verdade é que ninguém o fazia ficar tão nervoso quanto ela. Durante o dia, conversavam pouco, de noite, pensava nela. E sem dar por isso, ela despertou nele algo novo, e agora ele quer levá-la para onde for.

Precisa(mente) a sua casa temporária, o Instituto Ricardo Jorge foi onde o rapaz aprendeu muito, tendo um carinho grande por todos os que o acolheram. À Dona Laura, pela sua alegria e amizade, um terno abraço. À doutora Maria Antónia Calhau, por me permitir tamanha experiência e enriquecimento. Terá gostado muito, o menino, mas lembrou-se durante o caminho do seu lar, onde estava a sua mãe, querida irmã mais nova e pai, no coração.

PS: O texto não leva “obrigados”, pois na cabeça (maluca) do rapaz, aos amigos não é preciso agradecer!

Gostaria de deixar uma palavra muito especial à Mariana Alvoco Andrade por se ter disponibilizado para me acompanhar em todos os passos deste trabalho. Foi uma peça fulcral, que com a sua dedicação e paciência me ajudou no desenrolar deste processo, enquanto mentora.

## Resumo

As embalagens alimentares são atualmente fabricadas à base de polímeros sintéticos, como o polietileno, e têm como função principal a proteção de fatores externos como as alterações de temperatura, radiações, micro e macrorganismos. Em resposta à elevada procura nos últimos anos por uma melhoria no acondicionamento e aumento do tempo de vida útil dos alimentos, surgiram novas embalagens alimentares, nomeadamente as embalagens ativas. Estas embalagens têm o propósito de interagir com o alimento embalado através da emissão ou absorção de compostos e/ou substâncias, retardando os processos de degradação natural dos alimentos, como a oxidação lipídica ou o crescimento de microrganismos, aumentando assim o seu tempo de vida-útil. Existem dois tipos de embalagens ativas: de absorção e de emissão. No caso das embalagens ativas de emissão, estas contêm na sua matriz compostos ativos que interagem diretamente com o alimento embalado. Estes compostos podem ser de origem natural, sendo os extratos de plantas aromáticas uma opção válida, devido às suas propriedades biológicas como a capacidade antioxidante e antimicrobiana. A aplicação de extratos de plantas aromáticas nos alimentos tem sido estudada, sendo vários deles aprovados pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e pela União Europeia.

Com a sustentabilidade em mente, a indústria alimentar e a comunidade científica procuram, cada vez mais, biopolímeros que possam ser utilizados na produção de embalagens alimentares, como por exemplo a proteína de soro de leite, um subproduto da indústria dos laticínios.

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo da eficácia de um filme ativo edível, à base de proteína de soro de leite incorporado com um extrato de plantas aromáticas, no atraso da oxidação lipídica de um alimento com alto teor de gordura. Numa segunda parte do trabalho, foi também elaborado um inquérito à população portuguesa sobre hábitos de consumo de alimentos em conserva e sobre o seu conhecimento acerca de embalagens inovadoras.

Inicialmente foi comparada a capacidade antioxidante de extratos de duas plantas aromáticas, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e o chá verde (*Camellia sinensis* L.). O extrato de alecrim foi obtido através de um método de extração sólido-líquido, enquanto o chá verde foi adquirido diretamente sob a forma de extrato. Para a comparação da capacidade antioxidante, foram realizados quatro métodos: o sistema de inibição do radical livre DPPH, o teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, a determinação dos compostos fenólicos totais e a determinação dos flavonóides totais. De seguida, foi verificado se existia um efeito sinérgico entre os extratos, através da comparação da atividade antioxidante de três misturas com percentagens diferentes dos extratos de chá verde e alecrim. Foi também determinada a quantidade necessária de extrato para inibir 50 % do radical livre DPPH em solução ( $EC_{50}$ ). Com base nos resultados obtidos, foi escolhido o extrato de chá verde para a incorporação no filme ativo.

Posteriormente foi produzido o filme à base de proteína de soro de leite. O processo foi otimizado, tendo sido testadas diferentes percentagens de glicerol (plastificante) e extrato de chá verde a utilizar. O alimento modelo escolhido foi o salmão fresco, pelo seu alto teor lipídico e curto tempo de vida útil. Fatias de salmão fresco, de aproximadamente 30-35 g, foram embaladas com o filme ativo e com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e armazenadas a 5 °C, por diferentes tempos de armazenamento (0, 5, 7, 10, 14 e 17 dias). Testou-se também o nível de oxidação lipídica de fatias de salmão não embaladas, mantidas à mesma temperatura, durante 0, 3, 5, 7, 10 e 12 dias. Para a avaliação do estado oxidativo da gordura do salmão, foram utilizados quatro métodos: o índice de peróxidos, o valor de *p*-anisidina, o ensaio de TBARS e a monitorização do hexanal.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o filme ativo à base de proteína de soro de leite incorporado com extrato de chá verde, foi produzido com sucesso e mostrou eficácia no atraso da oxidação lipídica das amostras de salmão fresco até aos 17 dias de armazenamento. São necessários outros estudos para realizar a avaliação das propriedades mecânicas da embalagem, atividade

microbiológica, análise sensorial e mais testes de avaliação do estado oxidativo, com o intuito da comercialização da embalagem.

Em relação aos resultados do questionário, onde foram obtidas 314 respostas, foi verificado que a população portuguesa consome um elevado número de produtos em latas de conserva, nomeadamente o atum, apesar de poucos indivíduos terem conhecimento sobre a migração de compostos químicos da embalagem para os alimentos. No que diz respeito às embalagens alimentares inovadoras, uma pequena quantidade dos inquiridos possui conhecimento das funções que desempenham. No futuro, deverá ser feita uma divulgação da informação sobre estas embalagens, de forma a aumentar o grau de conhecimento da população portuguesa.

**Palavras-chave:** Embalagens ativas; Proteína de soro de leite; Plantas aromáticas; Chá Verde; Oxidação lipídica; Questionário

## Abstract

Food packaging is currently manufactured using synthetic polymers, such as polyethylene, and its main function is the protection against external factors such as temperature changes, radiation, micro and macroorganisms. In response to the last few years the high demand for an improvement in packaging and increase in foods shelf life, innovative packaging have emerged, including active packaging. These packages are intended to interact with packaged foods through the emission or the absorption of compounds and/or substances, delaying the natural process of food's degradation such as lipid oxidation or growth of microorganisms, thereby increasing its shelf life. There are two types of active packaging: absorption and emission. In the case of emission active packaging, they contain in their matrix active compounds that interact directly with the packaged food. These compounds may be of natural origin, being the extracts of aromatic plants a valid option due to their biological properties such as antioxidant and antimicrobial capacity. The application of extracts of aromatic plants in food have been studied, and several of them are approved by the FDA (Food and Drug Administration) and by the European Union.

With sustainability in mind, the food industry and the scientific community are increasingly looking for biopolymers that can be used in the production of food packaging, such as whey protein, a by-product of the dairy industry.

The main objective of this work was the study of the efficacy of an edible active film, based on whey protein incorporated with an extract of aromatic plants, in the delay of the lipid oxidation of a high fat food. In a second part of this work, a survey was also carried out on the Portuguese population about canned food consumption habits and their knowledge about innovative packaging.

Initially the antioxidant capacity of extracts from two aromatic plants, rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and green tea (*Camellia sinensis* L.) were compared. Rosemary extract was obtained by a solid-liquid extraction method, while green tea was obtained directly as an extract. In order to compare the antioxidant capacity, four methods were performed: the DPPH free radical inhibition system, the  $\beta$ -carotene bleaching test, the determination of the total phenolic compounds and the determination of the total flavonoids. Next, it was verified if there was a synergistic effect between the extracts, by comparing the antioxidant activity of three mixtures with different percentages of the extracts of green tea and rosemary. The required amount of extract to inhibit 50 % of the DPPH free radical ( $EC_{50}$ ) was also determined. Based on the obtained results, the green tea extract was the chosen one for the incorporation into the active film.

Afterwards, the whey protein based film was produced. The process was optimized and different percentages of glycerol (plasticizer) and green tea extract were tested. The chosen model food was fresh salmon, due to its high lipid content and short shelf life.

Fresh salmon slices, approximately 30-35 g, were packed with the active film and the control film (without green tea extract), and stored at 5 ° C for different storage times (0, 5, 7, 10, 14 and 17 days). The level of lipid oxidation of unpackaged salmon slices, maintained at the same temperature, for 0, 3, 5, 7, 10 and 12 days was also tested. To evaluate the oxidative status of salmon fat, four methods were used: the peroxide index, the p-anisidine value, the TBARS assay and the hexanal monitoring.

The results obtained in this work indicate that the active film based on whey protein, incorporated with green tea extract, was successfully produced and showed efficiency in delaying the lipid oxidation of fresh salmon samples up to 17 days of storage. Further studies are needed to evaluate the mechanical properties of the packaging, microbiological activity, sensorial analysis and additional tests for evaluation of the oxidative state, in order to commercialize the packaging.

Regarding the results of the questionnaire, where 314 responses were obtained, it was verified that the Portuguese population consumes a large number of products in canned foods, namely tuna. However, very few individuals are aware of the migration of chemical compounds from the packaging to foods.



In the case of innovative food packaging, a small number of respondents are aware of their functions. In the future, information on these packages should be disseminated in order to increase the knowledge of the Portuguese population.

**Keywords:** Active packaging; Whey protein; Aromatic plants; Green tea; Lipid oxidation; Inquiry

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Oxidação lipídica</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Mecanismo da oxidação lipídica.....	1
1.1.2	Métodos de Medição do Estado Oxidativo.....	2
<b>1.2</b>	<b>Plantas aromáticas</b> .....	<b>5</b>
1.2.1	Extratos de plantas aromáticas.....	5
1.2.2	Compostos Fenólicos.....	6
1.2.3	Propriedades Biológicas.....	7
1.2.4	Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	9
1.2.5	Chá Verde ( <i>Camellia sinensis</i> L.).....	10
<b>1.3</b>	<b>Salmão</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Embalagens Alimentares</b> .....	<b>13</b>
1.4.1	Migração.....	13
1.4.2	BPA e BADGE.....	14
1.4.3	Embalagens Alimentares Inteligentes.....	15
1.4.4	Embalagens Alimentares Ativas.....	15
<b>1.5</b>	<b>Proteína de Soro de Leite</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Preparação de Extrato de Plantas Aromáticas</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Amostras de <i>Camellia sinensis</i> L. e <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	18
3.1.2	Reagentes, Solventes e Padrões.....	18
3.1.3	Equipamentos e Material.....	18
3.1.4	Procedimento da Preparação do Extrato de Alecrim.....	18
<b>3.2</b>	<b>Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos</b> .....	<b>19</b>
3.2.1	Reagentes, solventes e padrões.....	19
3.2.2	Equipamentos e Material.....	19
3.2.3	Sistema de inibição do radical DPPH <sup>•</sup> .....	19
3.2.4	Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno.....	20
3.2.5	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais.....	20
3.2.6	Determinação dos Flavonoides Totais.....	21
<b>3.3</b>	<b>Seleção do extrato a incorporar no filme ativo</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Embalagem Ativa à Base de Proteína de Soro de Leite</b> .....	<b>22</b>
3.4.1	Reagentes e solventes.....	22
3.4.2	Equipamentos.....	22
3.4.3	Procedimento.....	22
3.4.4	Testes de Migração no filme ativo, com simulador alimentar.....	23
<b>3.5</b>	<b>Acondicionamento do Salmão na Embalagem Ativa</b> .....	<b>24</b>
3.5.1	Preparação da Amostra.....	24
3.5.2	Acondicionamento do Salmão.....	25
<b>3.6</b>	<b>Ensaio de Determinação da Oxidação Lipídica</b> .....	<b>25</b>
3.6.1	Amostras.....	26
3.6.2	Reagentes, solventes e padrões.....	26
3.6.3	Equipamentos e Material.....	26
3.6.4	Extração da Gordura.....	27
3.6.5	Perfil de Ácidos Gordos.....	27

3.6.6	Determinação do Índice de Peróxidos .....	27
3.6.7	Determinação do valor de <i>p</i> -anisidina .....	28
3.6.8	Ensaio de TBARS .....	28
3.6.9	Ensaio do Hexanal .....	28
<b>3.7</b>	<b>Questionário .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....</b>	<b>29</b>
4.1.1	Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno.....	30
4.1.2	Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e em flavonoides totais .....	32
4.1.3	Sinergia entre os Extratos .....	34
<b>4.2</b>	<b>Desenvolvimento da Embalagem Ativa.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Otimização da incorporação do glicerol e do extrato de Chá Verde.....	35
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do estado de oxidação lipídica do alimento modelo embalado em filmes ativos</b>	<b>36</b>
4.3.1	Identificação de ácidos gordos .....	36
4.3.2	Determinação do Índice de peróxidos.....	38
4.3.3	Ensaio de TBARS .....	38
4.3.4	Determinação do valor de <i>p</i> -anisidina .....	39
4.3.5	Ensaio do Hexanal .....	40
<b>4.4</b>	<b>Ensaio de Migração .....</b>	<b>41</b>
4.4.1	Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno.....	42
<b>4.5</b>	<b>Questionário .....</b>	<b>43</b>
4.5.1	Hábitos de consumo relativamente a alimentos em conserva .....	43
4.5.2	Conhecimento acerca de embalagens ativas e inteligentes .....	43
4.5.3	Resultados do questionário .....	45
<b>4.6</b>	<b>Revisão Bibliográfica de BPA e BADGE .....</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
<b>8.1</b>	<b>Anexo I - Revisão Bibliográfica de BPA e BADGE .....</b>	<b>59</b>
<b>8.2</b>	<b>Anexo II - Questionário sobre Hábitos de Consumo e Embalagens Inovadoras .....</b>	<b>70</b>
<b>8.3</b>	<b>Anexo III - Comunicações Nacionais sob a forma de <i>Poster</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>8.4</b>	<b>Anexo IV - Comunicações Nacionais sob a forma de <i>Poster – Abstracts</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>8.5</b>	<b>Anexo V - Comunicações Orais Internacionais/Nacionais .....</b>	<b>82</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema simplificado da fase de iniciação da oxidação lipídica. ....	2
Figura 1.2. Esquema simplificado da fase de propagação da oxidação lipídica. ....	2
Figura 1.3. Esquema simplificado da fase de terminação da oxidação lipídica. ....	2
Figura 1.4. Esquema simplificado de uma reação de um radical livre com um antioxidante. ....	8
Figura 3.1. Folhas secas de alecrim à esquerda e extrato de alecrim à direita. ....	18
Figura 3.2. Filme ativo (com extrato) na fase de evaporação do solvente. ....	22
Figura 3.3. Células de Migração. ....	23
Figura 3.4. Esquema representativo do ensaio de migração da embalagem ativa com o simulador etanol 95 % e esquema representativo do ensaio de migração com o solvente metanol. MeOH – Metanol; EtOH - Etanol. ....	24
Figura 3.5. Salmão fresco disposto em fatias de 30-35 g, antes de ser embalado. ....	25
Figura 3.6. Salmão acondicionado pelo filme ativo (com extrato de chá verde) após 17 dias de armazenamento. ....	25
Figura 3.7. Fatia de salmão triturada no moinho granulador. ....	26
Figura 4.1. Comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH• a amostras que continham extrato de chá verde e alecrim, de concentrações diferentes. ....	30
Figura 4.2. Comparação dos resultados do teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno em amostras de extrato de chá verde e alecrim. ....	32
Figura 4.3. Comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH• a extratos individuais de chá verde e alecrim e a misturas. Mistura 1 - 25 % extrato de alecrim e 75 % extrato de chá verde; Mistura 2 - 50 % de extrato de alecrim e 50 % de ex. ....	34
Figura 4.4. Otimização da incorporação de glicerol e extrato de chá verde no filme ativo. F1 - 2 % de extrato e 5 % de glicerol; F2 - 1 % de extrato e 5 % de glicerol; F3 - 2 % de extrato e 8 % de glicerol; F4 - 1 % de extrato e 8 % de glicerol. ....	35
Figura 4.5. Resultados do ensaio de TBARS para amostras de salmão fresco não embaladas, embaladas com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com 1 % de extrato de chá verde). MDA – Malonaldeído. ....	38
Figura 4.6. Resultados da determinação do valor da p-anidissina para amostras de salmão fresco não embaladas, embaladas com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com extrato de chá verde incorporado). ....	40
Figura 4.7. Comparação dos resultados do teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno, entre o simulador etanol 95 % e o solvente metanol, em amostras sujeitas a condições de armazenamento diferentes: temperatura (5, 20 ou 40 °C) e face do filme ativo (brilhante ou baça). ....	42
Figura 4.8. Distribuição percentual do sexo dos inquiridos (n=314). ....	44

Figura 4.9. Distribuição percentual das idades dos inquiridos (n=314).....	44
Figura 4.10. Distribuição percentual do nível de escolaridade dos inquiridos (n=314).....	45
Figura 4.11. Distribuição percentual da resposta à pergunta “Sabe o que são embalagens inteligentes” (n=314).....	46
Figura 4.12. Distribuição percentual da resposta à pergunta “Qual a função principal das embalagens inteligentes” (n=314). .....	47
Figura 4.13. Distribuição percentual da resposta à pergunta “Sabe o que são embalagens ativas” (n=314).....	47
Figura 4.14. Distribuição percentual da resposta à pergunta “Qual a função principal das embalagens ativas” (n=314).....	46

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Composição nutricional do salmão do atlântico ( <i>Salmo salar</i> L.) fresco, de acordo com a Tabela de Composição dos Alimentos Portuguesa (TCAP, 2018) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, 2018). Valores por 100 g.....	12
Tabela 1.2. Lista de Simuladores Alimentares, de acordo com o Regulamento (CE) nº 10/2011.....	14
Tabela 3.1. Misturas realizadas com os dois extratos de plantas aromáticas.....	21
Tabela 4.1. Resultados do ensaio do radical DPPH expresso em Percentagem de Inibição (%) e µg de Equivalentes Trolox por mL (µg ET/mL) (média ± DP) para o Extrato de Chá Verde (ECV) e Extrato de Alecrim (EA). Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).....	30
Tabela 4.2. Comparação dos resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais em amostras que continham extrato de chá verde e alecrim, de concentrações diferentes. ECV – Extrato de Chá Verde; EA – Extrato de Alecrim. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).....	32
Tabela 4.3. Percentagem de ácidos gordos presentes no salmão fresco, salmão embalado com filme controlo 0%, salmão embalado com filme ativo 1% e na Tabela de Composição de Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no site do PortFIR, respetivamente.....	37
Tabela 8.1. Resumo da revisão bibliográfica referente aos métodos cromatográficos utilizados na determinação de BPA e BADGE.....	59
Tabela 8.2. Resumo da revisão bibliográfica referente à determinação de BPA e BADGE em materiais em contato com alimentos. ....	65

## Lista de Abreviaturas

- AA - Ácido Araquidónico (do inglês, *Arachidonic Acid*)
- AAC - Coeficiente da Atividade Antioxidante (do inglês, *Antioxidant Activity Coefficient*)
- ALA - Ácido  $\alpha$ -Linolénico (do inglês,  *$\alpha$ -Linolenic Acid*)
- AO - Ácido Oleico (do inglês, *Oleic Acid*)
- AOAC - *Association for Official Analytical Chemists*
- AOCS - Sociedade Americana de Químicos de Óleos (do inglês, *American Oil Chemists' Society*)
- AV - Valor de *p*-anisidina (do inglês, *Anisidine Value*)
- BADGE - Éter Diglicídico do Bisfenol A (do inglês, *Bisphenol A Diglycidyl Ether*)
- BHA - Hidroxianisol butilado (do inglês, *Butylated Hydroxyanisole*)
- BHT - Hidroxitolueno butilado (do inglês, *Butylated Hydroxytoluene*)
- BPA - Bisfenol A (do inglês, *Bisphenol A*)
- CE - Comissão Europeia
- DAD - Detetor de Díodos (do inglês, *Diode Array Detection*)
- DHA - Ácido Docosa-hexaenóico (do inglês *Docosahexaenoic Acid*)
- 2,4-DNPH - 2,4-Dinitrofenilhidrazina
- DPA - Ácido Docosa-pentaenóico (do inglês, *Docosapentaenoic Acid*)
- DPPH - 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
- EA – Extrato de Alecrim
- EAG - Equivalentes de Ácido Gálico
- EC<sub>50</sub> - Concentração Eficaz (do inglês, *Effective Concentration*)
- ECE - Equivalentes de Epicatequina
- ECV – Extrato de Chá Verde
- EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético (do inglês, *Ethylenediaminetetracetate Acid*)
- EPA - Ácido Eicosapentaenóico (do inglês, *Eicosapentanoic Acid*)
- ET - Equivalentes de Trolox
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FID - Detetor de Ionização de Chama (do inglês, *Fluorescent Detector*)
- FL - Fluorescência (do inglês, *Fluorescence*)
- GC - Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*)
- GRAS - *Generally Recognized as Safe*
- GTE - Extrato de Chá Verde, (do inglês, *Green Tea Extract*)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

IP - Percentagem de Inibição (do inglês, *Inhibition Percentage*)

IU – Unidade Internacional (do inglês, *International Unit*)

LA - Ácido Linoleico (do inglês, *Linoleic Acid*)

LC - Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LME - Limite de Migração Específica

LMG - Limite de Migração Global

MDA - Malonaldeído

MS - Espectrômetro de Massas (do inglês, *Mass Spectrometer*)

NIR - Espectroscopia de Infravermelhos (do inglês, *Near Infrared Spectroscopy*)

NMR - Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PA - Ácido Palmítico (do inglês, *Palmitic Acid*)

PDA - Detetor de Fotodíodos (do inglês, *Photodiode Array Detector*)

PFE - Extração com Líquido Pressurizado (do inglês, *Pressurised Fluid Extration*)

PLA - Ácido Polilático (do inglês, *Polylactic Acid*)

PUFA - Ácidos Gordos Polinsaturados (do inglês, *Polyunsaturated Fatty Acid*)

PV - Índice de peróxidos (do inglês, *Peroxide Value*)

RAE – Equivalentes de Atividade do Retinol (do inglês, *Retinol Activity Equivalent*)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

TBA - Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid*)

TBARS - Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TCA - Ácido Tricloroacético (do inglês, *Trichloroacetic Acid*)

UPLC® - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatograph*)

USDA - *United States Department of Agriculture*

USE - Extração Ultrassônica (*Ultrasonic Extraction*)

UV - Ultravioleta

WHO - *World Health Organization*

WPC - Concentrado de Proteína de Soro de Leite (do inglês, *Whey Protein Concentrate*)

WPH - Proteína de Soro de Leite Hidrolisada (do inglês, *Whey Protein Hydrolyzed*)

WPI - Isolado de Proteína de Soro de Leite (do inglês, *Whey Protein Isolate*)



# 1 Introdução

## 1.1 Oxidação lipídica

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com uma cadeia de 4 a 28 átomos de carbono ligados entre si. Quando uma molécula de glicerol é associada a 1, 2 ou 3 ácidos gordos, denomina-se monoglicérido, diglicérido ou triglicérido, respetivamente. Adicionalmente a estas 3 moléculas, os lípidos são constituídos por ácidos gordos livres, fosfolípidos, glicolípidos, esteróis e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (St Angelo, 1996; Berset *et al.*, 1996) Os lípidos apresentam valor nutritivo, tendo funções de reserva, estruturais e energéticas para as células. Assim, a ingestão de alimentos com alto teor lipídico é necessária para uma dieta saudável e equilibrada (Márquez-Ruiz, 2008; Pokorny *et al.*, 2001).

Os alimentos estão expostos a fatores externos como a luz, diferenças de temperatura, ação de microrganismos e ar, que os tornam suscetíveis a alterações nas suas características e composição. A oxidação é o processo de degradação natural responsável por estas modificações, conduzindo à formação de compostos potencialmente tóxicos, que diminuem a qualidade nutricional e organoléptica do alimento, tratando-se deste modo de uma fonte de enorme prejuízo económico para a indústria alimentar (Nerín, Tovar, & Salafranca, 2008; Yanishlieva, Marinova, & Pokorný, 2006).

A constituição dos alimentos tem influência no mecanismo da oxidação. No que diz respeito aos lípidos, existe uma correlação entre o grau de insaturação da porção lipídica e a suscetibilidade à oxidação. Desta forma, os alimentos com maior percentagem de lípidos insaturados estão mais suscetíveis. Isto deve-se às ligações duplas entre átomos de carbono, que sendo mais instáveis, permitem a reação de um maior número de moléculas de oxigénio, por conseguinte, maior oxidação (Brewer, 2011)

A oxidação lipídica, tem consequências, como por exemplo: a destruição de ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e linolénico) e vitaminas lipossolúveis, a diminuição do conteúdo calórico, e a rancidez o que produz aromas indesejáveis, alteração da coloração e perda do sabor. Consequentemente há uma redução da vida útil do alimento (Nerín *et al.*, 2008)

A oxidação lipídica é um processo sequencial, composto de 3 fases: iniciação, propagação e terminação (Ferrari, 1998).

### 1.1.1 Mecanismo da oxidação lipídica

Na primeira fase, as reações químicas podem ser promovidas pelo impacto ou absorção de energia e/ou por reações redox (Ferrari, 1998). O primeiro grupo de mecanismos diz respeito a situações em que os alimentos estão sujeitos a fontes de elevada energia ou radiação ionizante, por exemplo radiação ultravioleta (UV). As reações redox são catalisadas por metais de transição (reações de Haber-Weiss<sup>1</sup> e Fenton<sup>2</sup>) ou enzimas, acopladas a organelos ou isoladas (Ferrari, 1998). Estes fatores, que têm a capacidade de romper a barreira eletroquímica entre o oxigénio e os ácidos gordos insaturados (RH), são iniciadores da oxidação lipídica. Assim, a fase de iniciação ocorre quando um iniciador interage com o oxigénio, que ativado, pode reagir com o ácido gordo insaturado. Isto resulta na perda de um átomo de hidrogénio (H•) e consequente formação de radicais aquilo (R•), como ilustrado na Figura 1.1. Depois de iniciada, a reação só termina aquando do esgotamento das reservas de oxigénio e ácidos gordos insaturados (Ferrari, 1998).

---

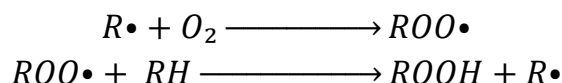
<sup>1</sup> A reação de Harber-Weiss produz radicais hidroxilo a partir de uma reação de ferro (III) com peróxidos de hidrogénio e superóxidos. O ferro é o catalisador.

<sup>2</sup> A reação de Fenton é a etapa seguinte da reação de Haber-Weiss, onde o ferro (II) reage com peróxido de oxigénio.



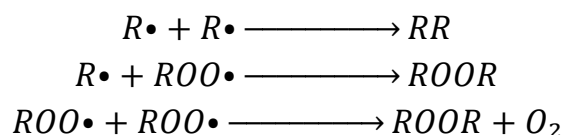
**Figura 1.1.1.** Esquema simplificado da fase de iniciação da oxidação lipídica (Adaptado de Ferrari, 1998).

Na segunda fase, ou fase de propagação, os radicais provenientes da fase de iniciação são convertidos noutros radicais instáveis, os peróxidos ( $ROO\bullet$ ). Estes reagem com um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado, originando os produtos primários da oxidação, os peróxidos e hidroperóxidos ( $ROOH$ ), como simplificado na Figura 1.2. (Ferrari, 1998; Koleva, 2007). Estes subprodutos não modificam o sabor do alimento, mas permitem o aparecimento de pigmentações castanhas ou amarelas nos tecidos (Hamilton, 1997).



**Figura 1.1.2.** Esquema simplificado da fase de propagação da oxidação lipídica (Adaptado de Koleva, 2007).

Na última fase, de terminação, existe a formação de compostos estáveis não reativos, que advêm das reações entre radicais, designados produtos secundários da oxidação (compostos voláteis e não voláteis). Estes compreendem os álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, que são derivados da decomposição de peróxidos (Figura 1.3.). Estas substâncias são causadoras de sabores e odores não desejáveis nos alimentos, de nome ranço (Ferrari, 1998; Koleva, 2007; Hamilton, 1997).



**Figura 1.1.3.** Esquema simplificado da fase de terminação da oxidação lipídica (Adaptado de Koleva, 2007).

Para retardar a oxidação lipídica, a indústria alimentar utiliza compostos antioxidantes, de origem sintética ou natural, que podem ser incorporados nas embalagens que acondicionam os produtos ou diretamente nos mesmos, de forma a aumentar o tempo de vida útil dos alimentos.

## 1.1.2 Métodos de Medição do Estado Oxidativo

A avaliação do estado oxidativo dos alimentos é essencial à indústria alimentar, de forma a quantificar e garantir a qualidade do produto durante a produção, bem como determinar a sua vida útil (McClements & Decker, 2000).

Existem vários métodos para avaliar a oxidação dos alimentos, com base em alterações nas propriedades químicas, físicas ou sensoriais, que definem a extensão da deterioração lipídica. Porém, não há apenas um método que detete todas as modificações oxidativas, sendo necessário utilizar um conjunto de métodos que se complementam na avaliação do alimento. Estes podem ser divididos em dois grupos: os que avaliam os produtos primários da oxidação lipídica, formados nas fases de iniciação e propagação e os que determinam os produtos secundários, que se formam na fase de terminação, a partir da degradação dos hidroperóxidos (Shahidi et al., 2008).

Para este trabalho recorreram-se a quatro métodos para avaliar o estado oxidativo do alimento modelo: o índice de peróxidos, a determinação do valor de p-anisidina, o Ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) e a monitorização do hexanal. Foi realizado o estudo do perfil dos ácidos gordos.

### 1.1.2.1 Perfil de Ácidos Gordos

A determinação dos lípidos totais e avaliação da composição de ácidos gordos nos alimentos é de grande importância para a Saúde Humana. O pescado é uma fonte considerável de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (PUFA, do inglês, *Polyunsaturated Fatty Acid*), que podem ter efeitos benéficos para o nosso organismo, nomeadamente na diminuição de doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, doenças autoimunes, obesidade, artrite reumatoide, depressão e asma. Os ácidos gordos quando não possuem ligações duplas na sua estrutura molecular são designados por ácidos gordos saturados (AGS), ao passo que, se possuírem pelo menos uma ligação dupla, são denominados por insaturados. Estes últimos podem ser monoinsaturados (MUFA, do inglês, *Monounsaturated Fatty Acids*), quando possuem apenas uma ligação dupla, ou polinsaturados quando possuem duas ou mais ligações duplas (Petrovic, 2010; Cascant, Breil, Fabiano-tixier, Garrigues, & Guardia, 2017).

A nomenclatura dos ácidos gordos insaturados é determinada através da localização da sua primeira ligação dupla, a contar da sua extremidade metilo. Assim, um ácido gordo com a primeira ligação dupla no terceiro átomo de carbono, será designado de *ómega 3* (Scorletti & Byrne, 2013).

Os PUFA *ómega 3* mais importantes são o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5n-3), o ácido docosa-hexaenóico (DHA; C22:6n-3) e o ácido docosa-pentaenóico (DPA; C22:5n-3), sendo o ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA; C18:3n-3), o precursor de EPA e DHA. Por outro lado, existem os PUFA *ómega 6*, sendo o ácido linoleico (LA; C18:2n-6) o precursor do ácido araquidónico (AA; 20:4n-6) (Cascant *et al.*, 2017). Certas espécies de peixes, como o salmão do atlântico (*Salmo salar* L.), possuem grande parte dos ácidos gordos supramencionados.

A cromatografia gasosa (GC, do inglês, *Gas chromatography*) acoplada a um detetor de ionização de chama (FID, do inglês, *Flame Ionization Detector*) é a técnica mais utilizada para a determinação do perfil de ácidos gordos em alimentos. Para tal, é necessária a saponificação dos ácidos gordos (clivagem dos ácidos gordos do glicerol) e a metilação dos ácidos gordos, de modo a serem obtidos os ésteres metílicos, que são posteriormente injetados no cromatógrafo (Cascant *et al.*, 2017; Petrovic, 2010).

### 1.1.2.2 Determinação do Índice de Peróxidos

Para quantificar o estado oxidativo da gordura de uma amostra, um dos métodos mais utilizados é o Índice de Peróxidos (PV, do inglês, Peroxide Value). Os peróxidos e hidroperóxidos resultam da oxidação primária de gorduras e óleos, sendo que o PV fornece a informação da quantidade destes compostos numa amostra, em miliequivalentes de oxigénio por quilograma de gordura (meq O<sub>2</sub>/kg gordura) (Mehta, Darji, & Aparnathi, 2015).

Na determinação do PV é utilizada a iodometria, método aprovado pela AOAC (do inglês, Association for Official Analytical Chemists), que se baseia na libertação de iodo através das reações redox entre os peróxidos (dissolvidos em soluções orgânicas) e o iodeto de potássio (solução saturada). O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio, usando como indicador da titulação uma solução de amido. Este método é adequado a muitas matrizes alimentares, mas possui algumas desvantagens, tais como a absorção do iodo pelas ligações insaturadas dos ácidos gordos da amostra, a libertação de iodo pela solução de iodeto de potássio, o pH, a temperatura da solução e a agitação a que a amostra está sujeita (Gray, 1978; Chen, Cai, & Zhang, 2016).

O processo de degradação de gorduras por oxidação lipídica dos ácidos gordos insaturados é o que está na origem da produção de peróxidos, contudo os seus níveis não aumentam proporcionalmente com a deterioração da gordura. Uma vez que os peróxidos são vulneráveis a reações químicas posteriores, os seus valores decrescem na fase de terminação da oxidação. Apresentam um pico antes da rancidez do alimento e, de seguida, diminuem levando à formação de aldeídos e ácidos gordos de cadeia curta, os responsáveis pelos odores e sabores desagradáveis. Assim, o teor de peróxidos varia de forma cíclica

durante a oxidação, sendo que um valor baixo não garante um estado oxidativo inicial da amostra (J. Chen et al., 2016; Gray, 1978).

Em suma, o valor obtido do índice de peróxidos é indicativo dos estádios iniciais da oxidação, mas é necessário um complemento com outros ensaios de forma a suportar a avaliação.

A Norma Portuguesa para a determinação do Índice de Peróxidos é a NP 904:1987.

### 1.1.2.3 Determinação do valor de *p*-anisidina

O valor de *p*-anisidina mede a presença de aldeídos (produtos da oxidação secundária), formados através da decomposição de peróxidos numa amostra de gordura. É um ensaio complementar ao índice de peróxidos, sendo este reativo a subprodutos da oxidação primária.

Numa solução de ácido acético, a *p*-anisidina reage com os aldeídos da amostra, produzindo compostos de cor amarela. A estrutura química dos aldeídos está relacionada com a intensidade da cor disposta, sendo a presença de ligações duplas um fator catalisador (Shahidi et al., 2005; Shahidi et al., 2008).

Este método é mais propenso a reagir a aldeídos insaturados do que a saturados, mas é um indicador fiável da rancidez e oxidação lipídica das gorduras animais e óleos vegetais (Shahidi et al., 2005).

A Norma Portuguesa para a determinação do valor de *p*-anisidina é a NP 1819:1984.

### 1.1.2.4 Ensaio de TBARS

O ensaio de TBARS tem como base a quantificação espectral do principal aldeído produzido durante a decomposição dos ácidos gordos insaturados em hidroperóxidos, na oxidação primária, o malonaldeído (MDA). Este composto reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *Thiobarbituric Acid*) e ocorre a produção de uma substância de cor vermelha, que é medida entre os 500 e 550 nm. A quantidade deste subproduto revela informação sobre o estado oxidativo da gordura do alimento (D. Miller, 1998; Osawa, De Felício, & Gonçalves, 2005).

Este método é dos mais utilizados para avaliar o estado de oxidação lipídica nos alimentos, principalmente de origem animal, e mais especificamente para pescado e produtos à base de peixe (Osawa *et al.*, 2005; Ross & Smith, 2006).

Porém, este método possui algumas desvantagens. Uma das limitações é a produção de MDA por auto-oxidação das moléculas da amostra com as condições do ensaio, devido à temperatura a que a amostra é sujeita. Outra desvantagem é a possibilidade de sobrestimação dos resultados, devido ao facto de haverem outros compostos alimentares derivados da oxidação lipídica a reagirem com TBA (Oakes & Van Der Kraak, 2003; Ross & Smith, 2006).

### 1.1.2.5 Ensaio do Hexanal

Os aldeídos são os principais compostos voláteis resultantes da oxidação lipídica dos alimentos, são derivados da decomposição dos produtos primários (peróxidos) no processo oxidativo, estando relacionados com as modificações organolépticas dos alimentos e consequente perda da qualidade nutricional. O hexanal é um desses aldeídos, de baixo peso molecular. É produzido pela oxidação do ácido linoleico através do 13-hidroperóxido, catalisada por radicais livres, sendo considerado um bom indicador da oxidação lipídica (Sanches-Silva, Rodríguez-Bernaldo De Quirós, López-Hernández, & Paseiro-Losada, 2004; Ross & Smith, 2006).

A quantificação dos aldeídos é habitualmente realizada por cromatografia gasosa, devido às suas características de volatilidade, instabilidade e solubilidade em água. Contudo, também pode ser

utilizada cromatografia líquida, obrigando antes a uma derivatização<sup>3</sup> da amostra, em que, os agentes de derivatização mais utilizados são a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) e o cloridrato de hidroxilamina (PFBHA) ( Xu, Lv, Hu, & Song, 2010; Chen *et al.*, 2014).

## 1.2 Plantas aromáticas

A utilização de plantas no tratamento de doenças remonta a milhares de anos atrás. Esta prática tem vindo a acompanhar a Humanidade até aos dias de hoje (Wei Zheng & Wang, 2001; Mathé, 2009; Barata, Rocha, Lopes, & Carvalho, 2016). Estas plantas medicinais, como são denominadas, possuem componentes biologicamente ativos que têm influência fisiológica em processos metabólicos de organismos vivos. Com base em características como o aroma e o sabor, algumas destas plantas têm a denominação de plantas aromáticas (Mathé, 2009).

As plantas aromáticas como a sálvia (*Salvia officinalis* L.), o estragão (*Artemisia dracunculus* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), a hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) e o chá verde (*Camellia sinensis* L.) são utilizadas em áreas como a gastronomia (Wei Zheng & Wang, 2001; Kwee & Niemeyer, 2011; Obolskiy, Pischel, Feistel, Glotov, & Heinrich, 2011), onde são valorizadas pela sua cor e adição de sabor, tendo-se registado nos últimos anos um aumento no seu consumo a nível global (Daly, Jiwan, O'Brien, & Aherne, 2010). Tem sido crescente a sua utilização para aplicações terapêuticas (Calucci *et al.*, 2003; Ruiz Del Castillo, Blanch, & Herraiz, 2004), onde atrasam a deterioração dos tecidos resultante da ação dos radicais livres (Calucci *et al.*, 2003), podendo reduzir o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e cancro (Costa *et al.*, 2015; Daly *et al.*, 2010; Kwee & Niemeyer, 2011; Wei Zheng & Wang, 2001). Estas plantas exibem capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-tumoral, que advêm de fitoquímicos como as vitaminas, carotenoides, terpenos e compostos fenólicos, como os flavonóides. Entre estes fitoquímicos responsáveis pelas propriedades biológicas das plantas aromáticas, os compostos fenólicos são os que têm maior influência (Wei Zheng & Wang, 2001; Daly *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2015).

### 1.2.1 Extratos de plantas aromáticas

As propriedades biológicas das plantas aromáticas são provenientes de compostos que têm uma ação protetora contra a radiação e outros fatores externos. Devido a estas características, tem havido nos últimos anos um elevado interesse por extratos de plantas aromáticas e especiarias para aplicação nas áreas de medicina, cosmética e indústria alimentar (Daly *et al.*, 2010; Samotyja & Małecka, 2007).

Do ponto de vista alimentar, os extratos de plantas aromáticas são uma fonte relevante de antioxidantes naturais, sendo tão eficazes como os antioxidantes sintéticos, tornando-os deste modo potenciais substitutos dos mesmos (Hernández-Hernández, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores, & Guerrero Legarreta, 2009; Romano, Abadi, Repetto, Vojnov, & Moreno, 2009; Yanishlieva *et al.*, 2006). Um elevado número de extratos de plantas aromáticas é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (Negi, 2012; *Food and Drug Administration*, 2018), permitindo a sua utilização no setor alimentar como aditivos naturais, podendo assim conferir aos alimentos uma melhoria na qualidade química, microbiológica e sensorial.

A

Existem vários métodos com os quais se podem obter extratos de plantas aromáticas, como a extração sólido-líquido, a extração com líquido pressurizado (PFE, do inglês, *Pressurised Fluid Extration*), extração ultrassónica (USE, do inglês, *Ultrasonic Extraction*) e extração de refluxo (*Reflux extraction*).

---

<sup>3</sup> A derivatização é uma técnica que, por meio de uma reação química, transforma uma substância noutra com a mesma estrutura, mas propriedades diferentes. A substância resultante irá ter diferentes características, como a solubilidade, os pontos de fusão e ebulição, etc., que facilitarão a separação, deteção e quantificação de um determinado composto.

Vários solventes podem ser utilizados nestes métodos de extração, como o etanol, metanol, acetona, hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, etc. (Costa *et al.*, 2015; Chua, Latiff, & Mohamad, 2016).

Os extratos são constituídos por uma grande variedade de compostos, o que torna difícil a atribuição da responsabilidade pelas capacidades biológicas. A concentração, tipo de matriz e efeito de sinergia (entre extratos) são os fatores que podem influenciar a intensidade desta capacidade (Almela, Sánchez-Muñoz, Fernández-López, Roca, & Rabe, 2006).

Os extratos das plantas aromáticas são amplamente utilizados em vários alimentos, bebidas e aplicações cosméticas, quer como adstringentes ou como agentes aromatizantes (Ruiz Del Castillo *et al.*, 2004). São também incorporados em filmes ativos, por serem uma boa fonte de antioxidantes naturais, podendo aumentar o tempo de vida útil dos alimentos (Sanches-Silva, Franz, Freire, Sendon, & Losada, 2009).

## 1.2.2 Compostos Fenólicos

As plantas, como todos os seres vivos, estão sujeitas ao stress oxidativo, derivado da ação de radicais livres, espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e moléculas pró-oxidantes, de origem endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou exógena (aumento de temperatura, luz). Em resposta, exibem sistemas de defesa antioxidantes, como os compostos fenólicos, os carotenóides e os tocoferóis (Brewer, 2011).

A maioria dos antioxidantes naturais são compostos fenólicos. Estes podem ser encontrados em frutos, vegetais, especiarias e plantas aromáticas (Dinnies Santos, 2009).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas e contribuem para a sua defesa contra radiação ultravioleta, parasitas, agentes patogénicos e predadores. São responsáveis pelas características organoléticas, sendo distribuídos de forma diferencial pelas diversas partes da planta. O sabor amargo de certos frutos é um exemplo da ação destes compostos (Andrade, Ribeiro-Santos, Costa Bonito, Saraiva, & Sanches-Silva, 2018).

Com acentuada presença na dieta humana, os compostos fenólicos são constituídos por, pelo menos, um anel aromático (com 6 átomos de carbono) ligado a um ou mais grupos hidroxilo. A sua estrutura pode variar entre uma única molécula fenólica a polímeros complexos. São formados a partir do ácido cinâmico, que é sintetizado a partir da fenilalanina (Michalak, 2006; Sousa *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos de origem vegetal podem ser divididos em 4 grupos: ácidos fenólicos (ex: cafeico, gálico, rosmarínico), diterpenos fenólicos (ex: rosmanol, epirosmanol), flavonóides (ex: quercetina, catequina) e óleos voláteis (ex: eugenol, carvacrol, timol, mentol). A disposição dos grupos funcionais da estrutura nuclear é preponderante para a atividade antioxidante (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Brewer, 2011; Gomes, 2010; Wei & Ho, 2006).

Estes compostos podem ser identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com o auxílio de uma coluna C18, com um detetor de díodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*). Pode-se também utilizar Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), Espectroscopia de Infravermelhos (NIR, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) ou acoplar o HPLC a um Espectrómetro de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (Almela *et al.*, 2006; Robards, 2003).

Os compostos fenólicos são responsáveis por várias propriedades das plantas aromáticas, como a capacidade antioxidante e a capacidade antimicrobiana. Estas características ajudam a prevenir doenças causadas pelo *stress* oxidativo, como certas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamações crónicas e cancro (Dai & Mumper, 2010; Piccaglia *et al.*, 1993; Proestos, Sereli, & Komaitis, 2006; Sartoratto *et al.*, 2004).

Para a extração destes compostos de plantas frescas, congeladas ou secas é necessária a trituração ou moagem, habitualmente precedida de liofilização ou secagem ao ar, sendo a primeira o método mais eficaz na retenção de compostos fenólicos (Dai & Mumper, 2010).

### 1.2.3 Propriedades Biológicas

Os metabolitos secundários das plantas aromáticas são os principais responsáveis pelas propriedades biológicas destas plantas. O ácido rosmarínico, carvacrol, ácido cafeico e timol são alguns exemplos de compostos que conferem atividade anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, anti-mutagénica, etc. (Hossain, Barry-Ryan, Martin-Diana, & Brunton, 2011).

#### 1.2.3.1 Capacidade antioxidante

Os antioxidantes são compostos capazes de atrasar ou inibir a oxidação de lípidos e outras moléculas pela paralisação das fases de iniciação ou propagação da cadeia oxidativa. O poder antioxidante dos compostos fenólicos é derivado das suas propriedades redox, que levam à adsorção e neutralização de radicais livres, supressão de moléculas de oxigénio ou decomposição de peróxidos. Isto conduz à diminuição do stress oxidativo (Wei Zheng & Wang, 2001).

Pelas suas possíveis aplicações biológicas e farmacológicas, os antioxidantes são de grande benefício para a nutrição e, por conseguinte, para a Saúde Humana. Assim, os antioxidantes de origem natural têm vindo a ser alvo de interesse por parte das indústrias cosmética, farmacêutica e alimentar. Entre os compostos com poder antioxidante, podem-se destacar as vitaminas A, B6, C e E, o zinco, o selénio e os compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos fenólicos e flavonoides (Spáčil, Nováková, & Solich, 2008).

Em cosmética e na indústria alimentar a prevenção da oxidação é normalmente realizada com antioxidantes sintéticos. Os mais comumente usados são o hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *Butylated Hydroxytoluene*) e o hidroxianisol butilado (BHA, do inglês *Butylated Hydroxyanisole*) pelo seu baixo custo e estabilidade química. Por outro lado, estes antioxidantes sintéticos têm sido postos em causa devido à sua possível ação de promoção da carcinogénese, no organismo humano (Pereira de Abreu, Losada, Maroto, & Cruz, 2010; Wei Zheng & Wang, 2001). Por esta razão e pela maior procura dos consumidores, nos últimos anos, por produtos naturais, a comunidade científica e as indústrias têm investido na substituição de aditivos sintéticos por aditivos alimentares naturais (Cuvelier, Richard, & Berset, 1996; Erkan, Ayranci, & Ayranci, 2008). Contudo a utilização destes extratos de origem natural deve ser cuidadosa, sendo que a sua capacidade oxidante depende de muitos fatores, nomeadamente da sua concentração, ou seja, exceder a dose ideal de concentração para o desempenho da ótima capacidade antioxidante do extrato poderá ter um efeito antagónico, resultando em efeitos pró-oxidativos e possível regeneração de radicais (Negi, 2012).

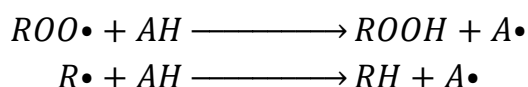
#### 1.2.3.2 Mecanismo de ação dos antioxidantes

Os radicais livres são moléculas instáveis e reativas, possuindo eletrões desemparelhados. Podem reagir com outras moléculas, capturando eletrões, e conseqüentemente transformando-as também em radicais livres. Estas reações sequenciais têm de nome oxidação em cadeia (Genena, 2005).

Quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato, os antioxidantes têm uma ação retardante da oxidação lipídica (Atoui, Mansouri, Boskou, & Kefalas, 2005). Fazem-no protegendo os lípidos do contacto com os precursores do mecanismo oxidativo ou inibindo as fases de iniciação e propagação da oxidação lipídica (Lidon *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são classificados em primários, secundários, sinergistas, supressores de oxigénio, agentes quelantes, antioxidantes mistos e biológicos (Ramalho & Jorge, 2006). Os primários reduzem diretamente os radicais livres, enquanto os secundários previnem a formação dos radicais, por exemplo através da absorção da radiação ultravioleta (Gonçalves, 2010).

Existem dois mecanismos de ação dos antioxidantes (AH) primários para estabilizar os radicais livres: cedência de um elétron e/ou de átomos de hidrogénio, com a formação de um radical inerte (A•), como ilustrado na Figura 1.4.



**Figura 1.1.4.** Esquema simplificado de uma reação de um radical livre com um antioxidante.

Os antioxidantes não se tornam radicais livres após doarem elétrons ou átomos, pois são compostos estáveis sob qualquer forma (Atoui *et al.*, 2005). A transferência de um elétron ou átomos pode ocorrer simultaneamente, sendo o processo dominante determinado pela estrutura e propriedades do antioxidante (solubilidade, energia de dissociação da ligação e potencial de ionização) (Figueiredo & Barroso, 2007).

Os átomos de hidrogénio provenientes dos antioxidantes são capturados mais facilmente por radicais livres do que os oriundos de lípidos insaturados, prevenindo a oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).

Os antioxidantes sinérgicos têm a função de aumentar a atividade dos primários, aquando de uma combinação adequada.

Os supressores de oxigénio são compostos que, como o nome indica, sequestram o oxigénio do meio, tornando-o indisponível para a oxidação.

Os antioxidantes biológicos são enzimas, de exemplo as catalases e a glutatona peroxidase, que têm a capacidade de remover o peróxido de hidrogénio. Outros compostos biológicos, como os agentes quelantes, também têm a capacidade de remover compostos reativos da matriz do alimento. Um exemplo é o ácido etilendiaminotetracetato (EDTA) que se liga a iões metálicos, como o ferro e o cobre, que têm influência na oxidação lipídica.

Por último, os antioxidantes mistos incluem compostos de origem animal e vegetal. Entre eles estão os flavonoides e o ácido cafeico (Ramalho & Jorge, 2006).

O desenvolvimento de antioxidantes sintéticos teve um período de muita utilização pela indústria alimentar, mas estudos mostraram que estes não seriam próprios para consumo a longo prazo (Koşar, Dorman, & Hiltunen, 2005). Atualmente, o uso destes compostos como aditivos alimentares tem um limite segundo o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 e suas alterações, da Comissão Europeia. Perante isto, o interesse por investigar, adquirir e utilizar antioxidantes de origem natural, como o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e certos extratos de plantas, tem aumentado nos últimos anos (Hraš, Hadolin, Knez, & Bauman, 2000; Koşar *et al.*, 2005).



### 1.2.3.3 Métodos de medição da capacidade antioxidante

Para este trabalho foram utilizados quatro métodos para avaliar a capacidade antioxidante das amostras: o sistema de inibição do radical livre DPPH, o teste de branqueamento do  $\beta$ -caroteno, a determinação dos compostos fenólicos totais e a determinação dos flavonoides totais.

#### 1.2.3.3.1 Sistema de inibição do radical DPPH•

Este método é um dos mais utilizados na determinação da atividade antioxidante. Tem como base a avaliação da capacidade da amostra em captar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) à temperatura ambiente, não havendo desta forma o risco da deterioração das moléculas testadas devido à temperatura. As amostras reagem com uma solução metanólica de DPPH• e a redução ou captação do radical é avaliada espectralmente pela diminuição da absorvância da amostra num comprimento de onda de 515 nm (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997; Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Sánchez-Moreno, Larrauri, & Saura-calixto, 1998).

#### 1.2.3.3.2 Teste do Branqueamento do $\beta$ -Caroteno

Este ensaio mede a capacidade de compostos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica. O mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres pela peroxidação do ácido linoleico, promovida pelo calor. Como os radicais livres são moléculas instáveis, irão captar átomos de hidrogénio do  $\beta$ -caroteno, levando à sua oxidação e consequente descoloração. Através da adição de compostos antioxidantes à solução, é possível a inibição da descoloração, pois estes compostos vão reduzir os radicais livres formados, evitando a oxidação do  $\beta$ -caroteno. A atividade antioxidante é avaliada pelo estado de descoloração do  $\beta$ -caroteno, pela determinação da absorvância das amostras, a 470 nm (Amarowicz, Pegg, Rahimi-Moghaddam, Barl, & Weil, 2004; Mikami, Yamaguchi, Shinmoto, & Tsushida, 2009).

#### 1.2.3.3.3 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

Este ensaio tem como base a reação dos compostos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu. Em meio alcalino, através da transferência de eletrões dos compostos fenólicos para o molibdénio, componente do reagente, existe a formação de compostos de cor azul. No espectrofotómetro é determinado o teor de fenólicos totais da amostra, a 725 nm, onde quanto maior for a absorvância, maior é o conteúdo de fenólicos totais (Ndhala, Moyo, & Van Staden, 2010; Prior, Wu, & Kschaich, 2005).

#### 1.2.3.3.4 Determinação dos Flavonoides Totais

Este método quantifica um grupo de compostos fenólicos, os flavonoides, presentes numa amostra. A reação do ião alumínio  $Al^{+3}$  com os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonoides forma um complexo, que confere uma coloração amarela à solução, passando a vermelha em meio alcalino (Alvarez-Suarez *et al.*, 2009). A intensidade desta coloração é avaliada espectralmente a 510 nm, permitindo determinar a quantidade de flavonoides presentes na amostra (Palacios *et al.*, 2011).

Este procedimento é seletivo para a estrutura flavonoide pois os outros grupos de compostos fenólicos não originam cor quando em reação com o cloreto de alumínio (Palacios *et al.*, 2011).

## 1.2.4 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma planta aromática pertencente à família *Lamiaceae* (antigamente denominada *Labiatae*), com origem na região mediterrânea, na Europa, mas atualmente cultivado em diversas

regiões do mundo, em locais arenosos, próximos ao mar. Possui um ciclo perene, isto é, uma esperança de vida superior a 2 anos e pode atingir 2 metros de altura. É uma planta lenhosa, semi-arbustiva, e as suas folhas são estreitas, lineares e coriáceas, sendo a face superior verde-escura e a inferior cinzenta, enquanto as flores são de cor azul-violeta (Dumbravă & Moldovan, 2012; Ibanez *et al.*, 2003; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Valones *et al.*, 2008).

É desde há muito tempo utilizado para fins medicinais e culinários. Na gastronomia, é habitualmente usado em pó, a partir das folhas. Pela sua adição de sabor, é usado de modo frequente na cozinha mediterrânea na preparação de alimentos e bebidas, para tempero de carne, pescado, sopa, molhos, ensopados, compotas ou chá. Tem um sabor amargo e um odor fragrante. Devido às suas propriedades terapêuticas, *R. officinalis* L. é aplicado à medicina tradicional, e através da administração oral das suas partes aéreas (porções da planta que se situam acima da terra) para combater inflamações, artrite, cicatrização, cólicas renais, doenças respiratórias (como expetorante), dores de cabeça e abdominais, a facilitação no processo da digestão, ação antidepressiva e analgésica. Também é conhecido pelas suas capacidades antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2009).

Tanto em extrato como no seu estado original, o alecrim pode ser utilizado como conservante alimentar, sendo um aditivo natural autorizado pela Comissão Europeia (Diretivas 2010/67/EU e 2010/69/EU) (Comissão Europeia, 2010a, 2010b).

Os principais compostos presentes no alecrim são o ácido rosmarínico, o ácido carnósico e o carnosol (derivado do ácido carnósico). Estes constituintes são compostos fenólicos, de elevada capacidade antioxidante prevenindo a ação oxidativa de radicais livres (Andrade *et al.*, 2018; Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Ibañez *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2009). O ácido rosmarínico é o maior responsável pela atividade antioxidante dos extratos de alecrim. Está também ligado a várias atividades biológicas, sendo descrito como antibacteriano, antiviral e anti-mutagénico. Pode ter efeito terapêutico em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson. O ácido carnósico e o carnosol possuem características anti-tumorais e anti-inflamatórias, e as suas concentrações em *R. officinalis* L. dependem de fatores edafoclimáticos (localização geográfica da planta, altura da colheita, disponibilidade de água e outros nutrientes, temperatura do meio ambiente) (Almela *et al.*, 2006; Cuvelier *et al.*, 1996; González-Trujano *et al.*, 2007; Moreno, Scheyer, Romano, & Vojnov, 2006; Ribeiro-Santos *et al.*, 2015).

### 1.2.5 Chá Verde (*Camellia sinensis* L.)

As folhas de *Camellia sinensis* L. são popularmente utilizadas para a preparação de chá, uma das bebidas mais antigas e globalmente consumida (Baptista, Tavares, & Carvalho, 1999a, 1999b; Lorenzo & Munekata, 2016). Uma lenda chinesa conta que a descoberta do chá e das suas propriedades benéficas para a saúde humana remetem para o ano de 2737 a.C., quando o imperador chinês Sheng Nong torna obrigatório que toda a água do império fosse fervida antes do consumo. Esta medida era instaurada em resposta a várias epidemias que devastavam o seu país. Em outra ocasião, enquanto descansava debaixo de uma árvore de *Camellia sinensis* e os seus súbditos ferviam a sua água, uma folha caiu na sua bebida, mudando a sua cor. O imperador decidiu provar o preparado, ficando surpreendido com o sabor agradável (Wheeler & Wheeler, 2004; Moderno *et al.*, 2009).

A *Camellia sinensis* é uma planta arbustiva da família *Theaceae*, nativa da região do este e sudeste asiático, os principais produtores são a China, Japão e Índia, apesar de nos dias de hoje ser cultivada de forma global, em zonas tropicais e subtropicais. Na Europa, apenas no arquipélago dos Açores, na ilha de São Miguel se cultiva esta planta. É mais apta a ambientes de elevada humidade, temperaturas amenas e solos ácidos, ao nível do mar ou em altitude até 2000 m acima deste. Tem um ciclo de vida longo e pode atingir os 2 m de altura, com folhas simples, alternas, inteiras, com margem serreada e

textura coriácea. As suas flores são pequenas, brancas, com quatro ou cinco pétalas, aparecendo nas axilas das folhas em grupos de dois, três ou quatro. O fruto é uma cápsula com dois ou três centímetros de diâmetro (Baptista, Lima, Paiva, Andrade, & Alves, 2012; Duarte & Menarim, 2006; Dufresne & Farnworth, 2001; Moderno *et al.*, 2009).

O nível de fermentação e oxidação classifica o chá de *Camellia sinensis* em três tipos:

- Chá verde, que retém a cor natural das folhas pois não sofre fermentação durante o processamento;
- Chá oolong, que é parcialmente fermentado;
- Chá preto, possui um mecanismo de fermentação mais longo que o oolong, que determina uma coloração mais escura e altera o sabor.

Quando não existe a secagem logo após a colheita, as folhas começam a murchar, ocorrendo a oxidação através de enzimas específicas como a polifenoloxidase. A este processo de oxidação dos compostos fenólicos segue-se a polimerização, o que comumente é designado de “fermentação”, com a possibilidade de interrupção, numa fase inicial, por aquecimento, que inibe a polifenoloxidase (Moderno *et al.*, 2009).

Substâncias com potencial antioxidante podem advir de fontes sintéticas ou naturais. O extrato de chá verde (GTE, do inglês *Green Tea extract*) pode ser mencionado como sendo rico em compostos fenólicos, que possuem atividade antioxidante, particularmente catequinas, e tem a designação de aditivo alimentar (Carrizo, Taborda, Nerín, & Bosetti, 2016).

### 1.3 Salmão

O salmão (*Salmo salar* L.) é um peixe com um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados, suscetíveis à oxidação lipídica aquando do armazenamento, com alteração do sabor, odor e diminuição do prazo de validade (Bell *et al.*, 2001). O salmão adulto atinge entre 40 a 120 cm de comprimento, pesando em média entre 3,6 e 5,4 kg. A sua distribuição inclui o Oceano Atlântico, bem como o Mar do Norte e Mar Báltico. Em Portugal, ocorre nos rios Lima, Minho, Cávado e Douro, no entanto, nos últimos anos ocorreu uma diminuição acentuada da população, sendo extintos dos últimos dois rios mencionados (Fay *et al.*, 2006). A Tabela 1.1 descreve a composição nutricional de *Salmo salar* L.

**Tabela 1.1** Composição nutricional do salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) fresco, de acordo com a Tabela de Composição dos Alimentos Portuguesa (TCAP, 2018) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, 2018). Valores por 100 g.

Nutriente	Unidade	Salmão Selvagem	Salmão Aquacultura	Salmão ( <i>Salmo salar</i> L.)
Água	g	68.5	65.9	60.5
Energia	kcal	142	208	262
Proteína	g	19.8	20.4	16.2
Lípidos Totais	g	<b>6.3</b>	<b>13.4</b>	<b>21.9</b>
Cinza	g	2.5	1.1	1.3
Hidratos de Carbono	g	0	0	0
Fibra	g	0	0	0
<b>Minerais</b>				
Cálcio (Ca)	mg	12	9	12
Ferro (Fe)	mg	0.8	0.3	0.5

<b>Nutriente</b>	<b>Unidade</b>	<b>Salmão Selvagem</b>	<b>Salmão Aquacultura</b>	<b>Salmão (<i>Salmo salar</i> L.)</b>
Magnésio (Mg)	mg	29	27	23
Fósforo (P)	mg	200	240	210
Potássio (K)	mg	490	363	300
Sódio(Na)	mg	44	59	38
Zinco (Zn)	mg	0.6	0.4	0.5
Cobre (Cu)	mg	0.3	0.05	-
Manganésio (Mn)	mg	0.02	0.01	-
Selénio (Se)	µg	36.5	24	-
<b>Vitaminas</b>				
Tiamina	mg	0.2	0.2	0.18
Riboflavina	mg	0.4	0.2	0.04
Niacina	mg	7.9	8.7	3.6
Ácido Pantoténico	mg	1.7	1.5	-
Vitamina B-6	mg	0.8	0.6	0.45
Ácido Fólico	µg	25	26	10
Vitamina B-12	µg	3.2	3.2	1.9
Vitamina A (RAE)	µg	12	58	33
Retinol	µg	12	58	-
Vitamina A (IU)	IU	40	193	-
<b>Lípidos</b>				
Ácidos gordos (Saturados)	g	1.0	3.1	4.2
14:0	g	0.1	0.6	-
16:0	g	0.6	1.9	-
18:0	g	0.2	0.5	-
Ácidos gordos (Monoinsaturados)	g	2.1	3.8	10
16:1 indiferenciados	g	0.3	0.8	-
18:1 indiferenciados	g	1.4	2.7	-
20:1	g	0.2	0.3	-
22:1 indiferenciados	g	0.3	0	-
Ácidos gordos (Polinsaturados)	g	2.5	3.9	5.1
18:2 indiferenciados	g	0.2	0.9	-
18:3 indiferenciados	g	0.3	0.2	-

Nutriente	Unidade	Salmão Selvagem	Salmão Aquacultura	Salmão ( <i>Salmo salar</i> L.)
18:4	g	0.1	0.1	-
20:4 indiferenciados	g	0.3	0.1	-
20:5 n-3 (EPA)	g	0.3	0.9	-
22:5 n-3 (DPA)	g	0.3	0.4	-
22:6 n-3 (DHA)	g	1.1	1.1	-
Colesterol	mg	55	55	40
<b>Referência</b>	-	USDA	USDA	TCAP

## 1.4 Embalagens Alimentares

As primeiras embalagens alimentares remetem às Guerras Napoleónicas, no início do século XIX, com o objetivo de conservar os alimentos do exército francês. Nicolas Appert utilizou frascos de vidro hermeticamente fechados para este fim de forma pioneira. Mais tarde, na 1ª e 2ª Guerras Mundiais, surgiram embalagens à base de petróleo, primeiramente para proteger munições e depois adaptadas ao acondicionamento de alimentos, cereais e biscoitos, especificamente. As embalagens dos dias de hoje são produzidas a partir de polímeros derivados do petróleo, como o polietileno (Brody, Bugusu, Han, Sand, & McHugh, 2008; Coles *et al.*, 2003)

O principal objetivo das embalagens alimentares convencionais é a proteção de fatores externos como o calor, luz, oxigénio, humidade, odores, enzimas, microrganismos, entre outros, que alteram as propriedades sensoriais dos alimentos, bem como a qualidade nutricional e segurança microbiológica. Existe também a função de facilitar o manuseamento dos produtos, bem como a informação dos consumidores do valor nutricional e composição alimentar (Brody *et al.*, 2008; Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008; Paseiro *et al.*, 2007).

As embalagens tradicionais protegem os alimentos contra a sua deterioração natural, mas apenas retardam os efeitos dos fatores externos, não combatendo a oxidação. Outra desvantagem é o facto de serem produzidas à base de materiais não biodegradáveis, levando a um problema ambiental, pela acumulação de resíduos (Brody *et al.*, 2008; Thøgersen, 1996).

Um dos pressupostos das embalagens convencionais para garantir a segurança dos consumidores é a não interação entre o material de acondicionamento e o produto alimentar protegido, para evitar a modificação do alimento pelo material da embalagem (Dainelli *et al.*, 2008).

### 1.4.1 Migração

Nas embalagens para alimentos, a migração é um processo de difusão de compostos do material de que é constituída a embalagem para a matriz alimentar, modificando as propriedades do alimento e da embalagem (Arvanitoyannis & Bosnea, 2004; Sanches Silva, Cruz Freire, Franz, & Paseiro Losada, 2008). Sendo que as embalagens convencionais são produzidas a partir de plásticos, a migração representa um possível problema de saúde, caso as substâncias tóxicas para os humanos migrem da embalagem para os alimentos. Desta forma e de acordo com o Regulamento (CE) nº 10/2011, foram estabelecidos limites legais para a migração dos componentes das embalagens para os produtos alimentares.

O limite de migração global (LMG) é o valor máximo permitido de substâncias não voláteis libertadas de um material ou objeto, que está destinado a entrar em contato com alimentos, para os simuladores alimentares, enquanto que o limite de migração específica (LME) é o valor máximo permitido de uma determinada substância libertada a partir de um material para os simuladores alimentares (Comissão Europeia, 2011; Costa, 2013). Na Tabela 1.2. estão apresentados os simuladores alimentares em vigor, de acordo com o Regulamento (CE) nº 10/2011 e suas alterações.

Segundo o Regulamento (CE) nº 10/2011, o valor LMG para as embalagens com constituintes de matéria plástica é de 10 mg de substância por dm<sup>2</sup> de área superficial em contato com o alimento, o correspondente a 60 mg/kg de alimento de migração limite. O valor do LME para as diferentes substâncias está definido no Anexo I do Regulamento (CE) nº 10/2011 e suas alterações. Para substâncias ainda não autorizadas oficialmente, o limite de migração máximo é de 0,01 mg/kg. As substâncias consideradas tóxicas para a reprodução, de carácter cancerígeno ou mutagénico não estão autorizadas a serem incorporadas em materiais destinados a estar em contato com alimentos (Comissão Europeia, 2011).

**Tabela 1.2.** Lista de Simuladores Alimentares, de acordo com o Regulamento (CE) nº 10/2011

<b>Simulador Alimentar</b>	<b>Abreviatura</b>
Etanol a 10 % (v/v)	Simulador Alimentar A
Ácido Acético a 3 % (m/v)	Simulador Alimentar B
Etanol a 20 % (v/v)	Simulador Alimentar C
Etanol a 50 % (v/v)	Simulador Alimentar D1
Óleo Vegetal	Simulador Alimentar D2
Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), granulometria 60-80 mesh, dimensão dos poros 200 nm	Simulador Alimentar E

#### 1.4.2 BPA e BADGE

Entre os compostos com probabilidade de migração para os alimentos, encontra-se o BPA (do inglês, *Bisphenol A*), um químico orgânico muito utilizado na produção de policarbonato e resinas epóxi, com aplicações na área da medicina e em embalagens alimentares (plásticos, películas aderentes, revestimento de latas de metal – latas de conserva e de refrigerantes, entre outros) (Barbonetti *et al.*, 2016; Luzio, Monteiro, Rocha, Fontainhas-Fernandes, & Coimbra, 2016; Xie, Wang, Xu, Sun, & Chen, 2010).

O BPA é um desregulador endócrino, alterando a atividade de estrogénios, testosterona e da hormona tiróide, com consequências mais graves para os lactentes. Pode também causar danos biológicos pelo stress oxidativo e induzindo a apoptose em células de vários tecidos (Barbonetti *et al.*, 2016).

A grande maioria das latas metálicas utilizadas para embalar alimentos apresentam um revestimento interno para proteger o alimento do metal e vice-versa. Este revestimento consiste num material epóxi-fenólico que tem por base BPA e epicloridrina (Coulier *et al.*, 2010). A reação entre estes dois compostos forma uma resina de baixo peso molecular pré-polimerizada, onde se inclui o BADGE (do inglês, *Bisphenol A Diglycidyl Ether*) (Coulier *et al.*, 2010).

As resinas epóxi à base de BADGE são aplicadas em latas de conserva de atum, espinafres, tomates, cervejas e refrigerantes. Este revestimento é amplamente usado pela indústria alimentar devido às suas características de conservação do sabor e propriedades físico-químicas (Simal-gándara *et al.*, 2010).

Existe indícios que o BADGE possa ter ação cancerígena, entre outros malefícios para a saúde humana. Contudo, há falta de estudos que comprovem esta informação, pelo que a sua utilização em materiais destinados ao contato com alimentos é permitido, mediante o cumprimento dos limites de migração legislados (Poole *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, tem vindo a existir uma maior preferência por produtos pré-confecionados, incentivado por uma alteração no estilo de vida dos consumidores, o que conduziu a indústria das embalagens alimentares a melhorar o acondicionamento e a desenvolver novos processos de combate à deterioração natural dos alimentos, originando embalagens inovadoras: as embalagens ativas e inteligentes (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015; Dainelli *et al.*, 2008).

### 1.4.3 Embalagens Alimentares Inteligentes

As embalagens inteligentes têm a função de monitorizar as condições do alimento embalado ou as condições do meio ambiente, por exemplo a temperatura. Os sistemas inteligentes podem ter uma barreira funcional a separá-los do alimento embalado, de modo a não haver a libertação dos seus constituintes para a matriz alimentar (Comissão Europeia, 2009; Dainelli *et al.*, 2008).

A classificação das embalagens inteligentes é feita de acordo com o parâmetro monitorizado. Por exemplo os indicadores de temperatura e tempo, os sistemas utilizados há mais tempo, possuem normalmente um mecanismo adesivo com alteração da coloração mediante as diferenças de temperatura e tempo de armazenamento (Yucel, 2016)

### 1.4.4 Embalagens Alimentares Ativas

Num sentido lato, poder-se-á dizer que as embalagens ativas nasceram, há milhares de anos, em certas regiões de África, Ásia e América do Sul, onde antigamente os povos nativos utilizavam folhas para guardar ou transportar alimentos, criando uma barreira aos agentes externos. Esta tradição também permitia uma transferência de sabores, cores, compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes (Dainelli *et al.*, 2008).

No entanto, o termo embalagem ativa é recente e refere-se a embalagens que interagem propositadamente com o alimento, quer através da libertação de compostos pela embalagem (embalagens emissoras) quer através da absorção de substâncias do meio envolvente (embalagens absorventes), podendo manter ou melhorar a qualidade organolética dos produtos e eventualmente prolongar o seu tempo de vida útil (Brody, Strupinsky, & Kline, 2001; Comissão Europeia, 2004; Dainelli *et al.*, 2008). Um exemplo de embalagens ativas são: os sistemas absorventes de humidade, os sistemas de captação de oxigénio e etileno e os sistemas emissores de substâncias como antioxidantes, conservantes, ou outros compostos (Comissão Europeia, 2009).

## 1.5 Proteína de Soro de Leite

As proteínas de soro de leite têm sido estudadas nas últimas décadas como ingredientes ou aditivos alimentares. Aquando da sua utilização como ingredientes, o leite e derivados possuem diversas vantagens. São incolores, têm um sabor suave, estão maioritariamente livre de toxinas e são moléculas estáveis (Ramos *et al.*, 2014).

O leite tem na sua constituição dois grupos de proteínas: as caseínas e as proteínas de soro de leite. As primeiras estão em maior quantidade no leite (80 %) e podem ser recuperadas a partir de leite desnatado (Ramos *et al.*, 2014). No que diz respeito às proteínas de soro de leite, estas apresentam propriedades como solubilidade, emulsificação e gelatinização. (Ngarize, Adams, & Howell, 2005; Pelegrine & Gasparetto, 2003; Perez-Gago & Krochta, 2001).

O soro de leite resulta do coalho, no fabrico do queijo, considerado durante muito tempo como poluente da indústria dos laticínios. Este resíduo era descartado sem tratamento, o que representava um problema para o ambiente. Porém, com a evolução da tecnologia, surgiram novas aplicações para as proteínas de soro de leite, sendo nos dias de hoje utilizadas como fonte de ingredientes proteicos comerciais, normalmente aliadas a bebidas desportivas. São também usadas em outros produtos da indústria alimentar, como na pastelaria, gelados, farinha láctea, entre outros (Pelegri & Gasparetto, 2003; Perez-Gago & Krochta, 2001; Ramos *et al.*, 2014).

A elevada procura, nos últimos anos, por produtos que não causem malefícios ao meio ambiente levou a indústria alimentar a desenvolver um interesse por embalagens edíveis e biodegradáveis. Estas podem ser de origem proteica, lipídica ou glicídica, de forma a corresponder às funções pretendidas para o filme (Sanches-Silva *et al.*, 2014).

Os filmes à base de proteínas têm propriedades funcionais como a facilidade na digestão, elevado valor nutricional, capacidade emulsionante e gelificante, e facilidade de ligação com a água (Ramos *et al.*, 2014; Sanches-Silva *et al.*, 2014).

A proteína de soro de leite pode existir sob a forma concentrada (WPC, do inglês *Whey Protein Concentrate*), isolada (WPI, do inglês *Whey Protein Isolated*) e hidrolisada (WPH, do inglês *Whey Protein Hydrolyzed*). A WPC apresenta o maior teor de lactose (6,0 %) e o menor teor de proteína (80 %) quando comparada com as outras formas de proteína de soro de leite. A WPH é a mais consumida por desportistas, devido à maior facilidade de absorção dos aminoácidos pelo organismo (Marshall, 2004).



## 2 Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um filme ativo, biodegradável e edível à base de proteína de soro de leite, incorporado com um extrato de plantas aromáticas, com o propósito de diminuir/inibir a oxidação lipídica de um alimento com elevado teor lipídico.

Neste sentido, diferentes objetivos específicos foram delineados:

i- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato de duas plantas aromáticas: chá verde (*Camellia sinensis* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.);

ii - Avaliar a capacidade antioxidante da mistura de ambos os extratos de modo a verificar um possível efeito sinérgico entre eles;

iii - Mediante os resultados, escolher o extrato ou mistura de extratos a integrar na constituição do filme ativo;

iv – Otimizar a preparação do filme ativo, no que se refere à quantidade de glicerol e extrato ou mistura de extratos a ser inserida na proteína de soro de leite;

v – Avaliar a eficácia antioxidante do filme ativo, embalando um alimento modelo de elevado teor lipídico (salmão fresco) durante diferentes tempos de armazenamento e determinando o seu estado de oxidação lipídica por diferentes métodos (PV, valor de *p*-anisidina, ensaio de TBARS e ensaio do hexanal).

O segundo objetivo deste trabalho é elaborar um questionário de modo a:

i - Avaliar os hábitos de consumo de uma amostra da população portuguesa, relativamente a alimentos em conserva;

ii - Aferir o conhecimento de uma amostra da população portuguesa acerca de embalagens ativas/inteligentes.

### 3 Materiais e Métodos

Todos os métodos descritos foram realizados nas instalações do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no laboratório do Departamento de Alimentação e Nutrição.

#### 3.1 Preparação de Extrato de Plantas Aromáticas

##### 3.1.1 Amostras de *Camellia sinensis* L. e *Rosmarinus officinalis* L.

No presente estudo utilizou-se chá verde e alecrim. As amostras de chá verde foram adquiridas já sob a forma de extrato. O alecrim foi adquirido seco, num estabelecimento comercial da zona da Grande Lisboa em janeiro de 2018.

##### 3.1.2 Reagentes, Solventes e Padrões

O solvente utilizado para a extração de alecrim foi o etanol absoluto da Merck (Darmstadt, Alemanha).

##### 3.1.3 Equipamentos e Material

Para a extração do alecrim utilizou-se um moinho granulador Grindomix GM200 (Haan, Alemanha), uma balança analítica Mettler Toledo XP 205 Delta Range (Columbus, EUA) com  $\pm 0,01$  mg de precisão, uma placa de agitação Edmund Bühler GmbH modelo KS-15 (Hechingen, Alemanha), uma centrífuga Eppendorf AG modelo 5804R (Hamburgo, Alemanha) e um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça).

##### 3.1.4 Procedimento da Preparação do Extrato de Alecrim

As amostras de alecrim foram trituradas com o auxílio de um moinho granulador a 10000 rpm, durante 15 a 30 segundos. De seguida, foram fechadas a vácuo e armazenadas num frigorífico a 5 °C, num local escuro, até à sua utilização.

Para um tubo de 50 mL, pesaram-se 5 g de amostra e adicionaram-se 50 mL de etanol absoluto, homogeneizou-se numa placa de agitação, durante 30 minutos, a 330 rpm, à temperatura ambiente. O passo seguinte foi centrifugar a 10000 rpm a 15 °C, durante 15 minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para um balão de evaporação, utilizando um evaporador rotativo evaporou-se o etanol a 35 °C, até à secura. Por último, retirou-se com a ajuda de uma espátula o extrato do balão de evaporação, armazenou-se a 5 °C, protegido da luz, sob condições de vácuo.



**Figura 3.1.** Folhas secas de alecrim à esquerda e extrato de alecrim à direita.

## 3.2 Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos

A determinação da capacidade antioxidante dos extratos foi realizada através de quatro métodos: o sistema de inibição do radical livre DPPH, o teste do branqueamento do  $\beta$ -Caroteno e a determinação dos compostos fenólicos e a determinação dos flavonoides totais. Para a realização dos ensaios, foram feitas soluções de extratos de alecrim e chá verde em etanol, de concentrações entre 0,1 e 5 mg/mL. Apenas para o ensaio do radical livre DPPH foram preparadas soluções de chá verde diluídas em metanol, dentro da mesma gama de concentrações.

### 3.2.1 Reagentes, solventes e padrões

Para a realização dos ensaios de determinação da capacidade antioxidante, os reagentes utilizados foram o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $\bullet$ ), ácido linoleico,  $\beta$ -Caroteno, Tween<sup>®</sup>40, reagente de Folin & Ciocalteu, nitrato de sódio, cloreto de alumínio, todos da marca Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha) e carbonato de sódio e hidróxido de sódio da marca Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os solventes utilizados foram o metanol *pro analyse*, de grau analítico, etanol absoluto e clorofórmio, todos da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura utilizada resulta de um sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA).

Para a construção das curvas de calibração foram utilizados os padrões de ácido gálico da Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) e epicatequina da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

### 3.2.2 Equipamentos e Material

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica Mettler Toledo XP 205 Delta Range (Columbus, EUA) com  $\pm 0,01$  mg de precisão; placa de agitação Edmund Bühler GmbH modelo KS-15 (Hechingen, Alemanha); espectrofotómetro U-2000 Hitachi; células de quartzo de medição de absorvância; evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça); bloco de aquecimento da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra); centrífuga Eppendorf AG, modelo 5804 R (Hamburgo, Alemanha) e vortex PVI da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra).

### 3.2.3 Sistema de inibição do radical DPPH $\bullet$

#### 3.2.3.1 Procedimento

O método utilizado foi descrito por Moure *et al.* (2001).

Preparou-se uma solução metanólica de DPPH de concentração 14,6  $\mu$ g/mL. Em tubos de 15 mL, colocou-se em reação 50  $\mu$ L de amostra e 2 mL da solução de DPPH. No caso das amostras controlo, utilizaram-se 50  $\mu$ L de etanol absoluto para o extrato de alecrim e 50  $\mu$ L de metanol para o extrato de chá verde, e 2 mL da solução de DPPH. Fizeram-se 3 réplicas de cada amostra. As amostras reagiram no escuro durante 30 minutos. Por último, mediu-se a absorvância a 515 nm contra metanol e calculou-se a percentagem de inibição (do inglês IP – *Inhibition Percentage*), de acordo com a equação 1.

$$IP (\%) = \frac{AC-AA}{AC} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

IP – Percentagem de Inibição  
 AC – Absorvância do Controlo  
 AA – Absorvância da Amostra

Na construção da curva de calibração foi utilizado o Trolox como padrão, com concentrações entre 10 e 150 µg/mL. O resultado da comparação das absorvâncias das amostras de plantas aromáticas com o padrão é dado em µg ET (Equivalentes de Trolox)/mL.

### 3.2.4 Teste do Branqueamento do β-Caroteno

#### 3.2.4.1 Procedimento

O método usado foi descrito por Miller (1971).

Prepararam-se amostras de extrato de alecrim e chá verde em etanol absoluto, de concentrações diferentes. Preparou-se uma solução de β-caroteno em clorofórmio, de concentração 0,2 mg/mL. De seguida, para um balão de evaporação, adicionou-se 20 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween<sup>®</sup>40 e 1 mL da solução de β-caroteno. Evaporou-se o clorofórmio num evaporador rotativo a 40 °C. Adicionaram-se 50 mL de água ultrapura, saturada em oxigénio e agitou-se a solução de forma a criar uma emulsão.

Em tubos de 15 mL, a 0,2 mL de amostra adicionou-se 5 mL da emulsão de β-caroteno. As amostras controlo foram feitas com 0,2 mL de etanol absoluto e 5 mL de emulsão, e mediu-se de seguida a sua absorvância. Submeteu-se os tubos a 50 °C durante 2 horas num bloco de aquecimento. Após esse período, mediu-se a absorvância de todas as amostras e dos controlos. Calculou-se o coeficiente da atividade antioxidante (do inglês AAC – *Antioxidant Activity Coefficient*) através da equação 2.

$$AAC = \frac{AA-AC2}{AC0-AC2} \times 1000 \quad (2)$$

Onde:

AAC – Coeficiente de Atividade Antioxidante  
 AA – Absorvância da Amostra  
 AC0 – Absorvância do Controlo no tempo inicial  
 AC2 – Absorvância do Controlo após 2 horas

### 3.2.5 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

#### 3.2.5.1 Procedimento

Este método foi executado como descrito por Erkan, Ayranci and Ayranci (2008).

Para este ensaio foi necessária a preparação de uma solução *stock* de ácido gálico de concentração 10 mg/mL, uma solução aquosa de carbonato de sódio de 60 mg/mL e uma solução aquosa de Folin & Ciocalteu diluída 10 vezes.

A 1 mL de amostra adicionou-se 7,5 mL da solução de Folin & Ciocalteu e deixou-se repousar à temperatura ambiente. Após 5 minutos, adicionou-se 7,5 mL da solução de carbonato de sódio. De

seguida, as soluções foram mantidas no escuro durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após este período, mediram-se as absorvâncias a 725 nm, contra água.

Para a curva de calibração, fizeram-se diluições a partir da solução *stock* de ácido gálico, de concentrações entre 0,025 e 0,150 mg/mL. Os valores são apresentados em mg EAG (Equivalentes de Ácido Gálico)/g de amostra, e são calculados pela equação 3.

$$C = c \times vf \times ce \times \frac{ve}{m} \quad (3)$$

Onde:

C – Conteúdo Total de Compostos Fenólicos (mg/g)

c – Concentração de Ácido Gálico (mg/mL)

vf – Volume de Extrato (mL)

ce – Concentração do Extrato (mg/mL)

ve – Volume de Extração (mL)

m – Toma da Amostra (g)

### 3.2.6 Determinação dos Flavonoides Totais

#### 3.2.6.1 Procedimento

Esta determinação foi realizada segundo a metodologia de Yoo *et al.* (2008).

Foram preparadas soluções aquosas de nitrato de sódio a 5 % (p/v), cloreto de alumínio a 10 % (p/v), hidróxido de sódio 1 M e uma solução *stock* de epicatequina a 4 mg/mL.

A 1 mL da amostra, adicionou-se 4 mL de água ultrapura e 0,3 mL da solução de nitrato de sódio. Homogeneizou-se no vórtex e após 5 minutos adicionou-se 0,6 mL da solução de cloreto de alumínio. Voltou-se a homogeneizar durante 6 minutos, de seguida adicionaram-se 2 mL da solução de hidróxido de sódio e 2,1 mL de água ultrapura. Mediu-se a absorvância a 510 nm, contra água.

Para a curva de calibração, prepararam-se diluições a partir da solução *stock* de epicatequina, de concentrações entre 0,025 e 0,175 mg/mL. Os resultados são apresentados em mg ECE (Equivalentes de Epicatequina)/g de amostra, sendo calculados pela equação 3.

### 3.3 Seleção do extrato a incorporar no filme ativo

Depois da determinação da capacidade antioxidante dos extratos das plantas aromáticas em estudo, foram preparadas misturas com diferentes razões percentuais entre os dois extratos, para verificar a sinergia entre eles.

Efetuar-se 3 misturas diferentes, de concentração 0,8 mg/mL, como disposto na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Misturas realizadas com os dois extratos de plantas aromáticas.

Misturas	Alecrim	Chá Verde
Mistura 1	25 %	75 %
Mistura 2	50 %	50 %
Mistura 3	25 %	75 %

Para a avaliação da capacidade antioxidante das misturas realizou-se o ensaio do sistema de inibição do radical livre DPPH, descrito em 3.2.3.

De seguida, para calcular o EC<sub>50</sub> da mistura ou extrato individual, foram preparadas diluições e calculadas as suas IP. Obteve-se uma curva com os valores de inibição de acordo com as diferentes

concentrações do extrato, sendo possível estabelecer uma equação linear e calcular o EC<sub>50</sub> por interpolação (Cruz, Conde, Domínguez, & Parajó, 2007). Desta forma, com o método do DPPH obteve-se a concentração necessária do extrato ou mistura que inibe 50 % do radical DPPH (Cruz, Domínguez and Parajó, 2005).

### 3.4 Embalagem Ativa à Base de Proteína de Soro de Leite

Os filmes ativos foram preparados com um concentrado de proteína de soro de leite (WPC, do inglês *Whey Protein Concentrate*), glicerol, extrato de plantas aromáticas e água ultrapura.

#### 3.4.1 Reagentes e solventes

Para este procedimento foi utilizado WPC (80 %) (Glanbia Nutricionals, EUA), glicerol (Sigma-Aldrich, Alemanha), extratos de plantas aromáticas (preparação descrita no ponto 3.2) e água ultrapura.

#### 3.4.2 Equipamentos

Foi necessária a utilização de um sistema de purificação de água da Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, EUA), um homogeneizador Ultra Turrax IKA® DI 25basic (Staufen, Alemanha) e um banho termostático Memmert GmbH WB 14 (Hechingen, Alemanha).

#### 3.4.3 Procedimento

Para a realização do ensaio, seguiu-se a metodologia descrita por Bahram *et al.* (2014).

Adicionou-se 41 mL de água ultrapura a 4,91 g de WPC e homogeneizou-se com o Ultra Turrax a 8000 rpm durante 2 minutos. De seguida, submeteu-se a solução a um banho termostático a 80 °C por 30 minutos, para desnaturação da proteína. A solução foi arrefecida com a ajuda de gelo, por 15 minutos. Adicionou-se glicerol e o extrato de plantas aromáticas, homogeneizando com o Ultra Turrax até ter sido obtida uma solução homogênea. Por fim, foi armazenada à temperatura ambiente durante 48 horas, numa superfície antiaderente de Teflon® de 29,5 cm de diâmetro, para evaporação do solvente, como representa a Figura 3.2.

Com base no protocolo acima descrito, foram testadas 2 percentagens de glicerol, 5 e 8 % (p/p), e 2 percentagens de extrato de plantas aromáticas, 1 e 2 % (p/p), de forma a otimizar a consistência do filme ativo. Foram também testadas duas superfícies de armazenamento: papel de alumínio e tabuleiros de Teflon®.

Foram preparados filmes sem a incorporação de extrato de plantas aromáticas, como controlo. Para a etapa de evaporação do solvente, os filmes ficaram em salas diferentes, para evitar a contaminação.



**Figura 3.2.** Filme ativo (com extrato) na fase de evaporação do solvente.

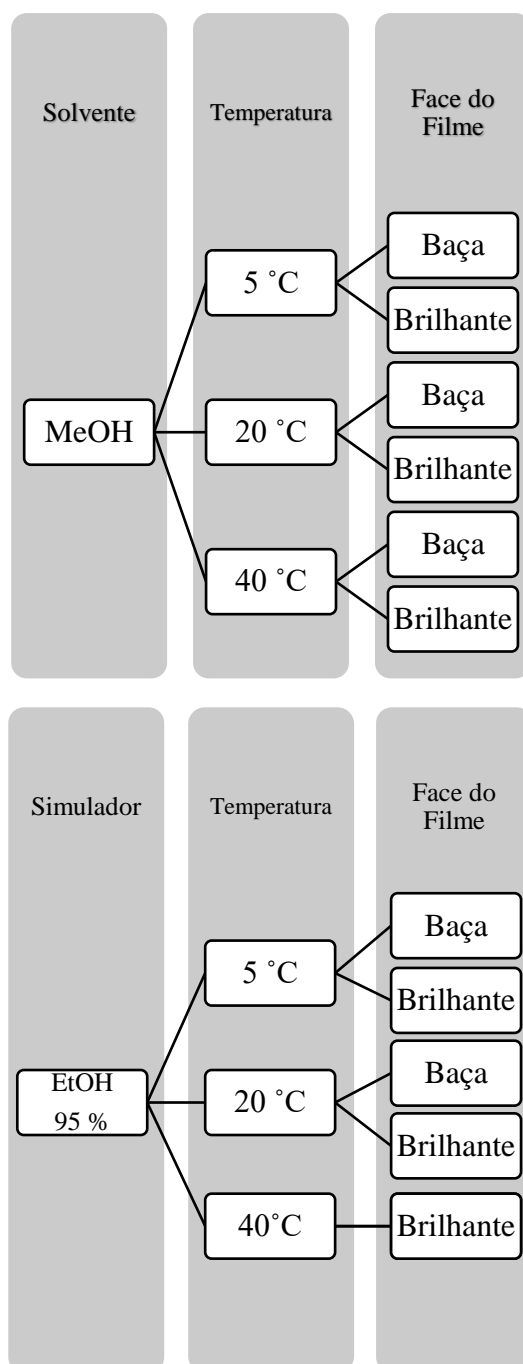
#### 3.4.4 Testes de Migração no filme ativo, com simulador alimentar.

Para a realização dos testes de migração no filme ativo de proteína de soro de leite após incorporação do extrato da planta aromática, o filme ativo foi cortado em círculos de 3,16 cm de diâmetro e colocado em contato com 10 mL de simulador de alimentos gordurosos (etanol a 95 % (v/v)). As amostras foram colocadas em cápsulas de migração (Figura 3.3.) com a face baça ou brilhante do filme em contacto com os simuladores e sujeitas a 3 temperaturas diferentes: 5, 20 e 40 °C, durante 10 dias, como esquematizado na Figura 3.4. Após os 10 dias de contacto, o simulador foi transferido para tubos e armazenado a -80 °C, protegido da luz, até a análise. Estes ensaios também foram realizados com o solvente metanol, uma vez que, este é um poderoso extrator de compostos bioativos, podendo posteriormente funcionar como termo de comparação com os resultados do simulador.

Foram realizados 4 ensaios de avaliação da capacidade antioxidante no simulador testado: Sistema de inibição do DPPH, branqueamento do  $\beta$ -caroteno e determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais.



**Figura 3.3.** Células de Migração.



**Figura 3.4.** Esquema representativo do ensaio de migração da embalagem ativa com o simulador etanol 95 % e esquema representativo do ensaio de migração com o solvente metanol. MeOH – Metanol; EtOH – Etanol.

## 3.5 Acondicionamento do Salmão na Embalagem Ativa

### 3.5.1 Preparação da Amostra

Com o objetivo de testar a eficácia do filme ativo, o alimento modelo escolhido foi o salmão fresco, pelo seu elevado teor lipídico. Este foi adquirido numa zona comercial de Lisboa, sendo de seguida preparado e disposto em fatias de 30-35 g, como representado na Figura 3.5. As amostras foram mantidas a -80 °C até a sua utilização.





**Figura 3.5.** Salmão fresco disposto em fatias de 30-35 g, antes de ser embalado.

### 3.5.2 Acondicionamento do Salmão

As amostras embaladas tiveram ambas as faces da fatia de salmão colocadas em contato com o filme de proteína de soro de leite. As fatias de salmão foram colocadas em sacos de polietileno e embaladas a vácuo, de forma a otimizar o contato do alimento modelo com o filme (Figura 3.6.). As amostras embaladas com o filme controle (sem extrato) e com o filme ativo foram mantidas a 5 °C, protegidas da luz, durante períodos diferentes de armazenamento, 0, 5, 7, 10, 12, 14 e 17 dias. Para estudar a oxidação natural do salmão, fatias de 35 g foram envoltas e protegidas da luz durante 0, 3, 5, 7, 10 e 12 dias.



**Figura 3.6.** Salmão acondicionado pelo filme ativo (com extrato de chá verde) após 17 dias de armazenamento.

## 3.6 Ensaios de Determinação da Oxidação Lipídica

Após cada período de armazenamento, as fatias de salmão foram analisadas, de forma a verificar a eficácia do filme ativo. Para tal realizaram-se 4 métodos diferentes para a avaliação do estado de oxidação lipídica das amostras: Índice de Peróxidos, determinação do valor de *p*-anisidina, ensaio de TBARS e ensaio do Hexanal.

### 3.6.1 Amostras

Passados os períodos de armazenamento de cada ensaio, as amostras de salmão foram trituradas com o auxílio de um moinho granulador a 10000 rpm, durante aproximadamente 30 segundos e armazenadas a -80 °C, protegidas da luz, até análise. A Figura 3.7. refere-se a uma amostra de salmão após trituração.



**Figura 3.7.** Fatia de salmão triturada no moinho granulador.

### 3.6.2 Reagentes, solventes e padrões

Utilizaram-se os seguintes reagentes: sulfato de sódio anidro, tiosulfato de sódio, ácido ortofosfórico, ácido tricloroacético e hidróxido de potássio, os cinco de gradiente analítico e da marca Merck (Darmstadt, Alemanha); iodeto de potássio, *p*-anisidina e ácido tiobarbitúrico provenientes da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha) e amido solúvel da Sigma-Aldrich Labochemikalien GmbH (Alemanha).

Os solventes utilizados foram: clorofórmio, metanol p.a. de grau analítico, isooctano analítico e ácido acético glacial analítico, os quatro da Merck (Darmstadt, Alemanha), *n*-hexano de gradiente para espectroscopia da BDH Prolabo (Leuven, Bélgica) e água ultrapura.

### 3.6.3 Equipamentos e Material

Foi utilizado um moinho granulador Grindomix GM200 (Haan, Alemanha), um homogeneizador Ultra Turrax IKA® DI 25basic (Staufen, Alemanha), uma balança analítica Mettler Toledo XP 205 Delta Range (Columbus, EUA) com  $\pm 0,01$  mg de precisão, um evaporador rotativo Büchi modelo R-210 (Labortechnik, Suíça), um vórtex PVI da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra), um espectrofotômetro U-2000 Hitachi, um bloco de aquecimento da Grant Instruments (Cambridge, Inglaterra), uma centrífuga Eppendorf AG modelo 5804R (Hamburgo, Alemanha), balões de evaporação e um sistema cromatográfico UPLC® ACQUITY™ da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com um detetor DAD (do inglês, *Diode Array Detector*), uma bomba binária, um amostrador automático e um sistema de termostato para a coluna. A pré-coluna utilizada foi uma ACQUITY™ UPLC® BEH C18 (2,1 x 5,0 mm, 1,7  $\mu$ m de tamanho de partícula) e a coluna analítica foi uma ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7  $\mu$ m de tamanho de partícula). Foi também utilizado um sistema cromatográfico Agilent 7890 GC (Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma coluna

SUPELCO 62009-03 (100 m x 250 µm x 0,2 µm), um injetor *back inlet* SS a 280 °C e um detector FID (do inglês, *Fluorescent Detector*).

### 3.6.4 Extração da Gordura

Para o estudo do perfil de ácidos gordos, e determinação do índice de peróxidos e do valor de *p*-anisidina, foi necessária a extração da gordura do salmão. O método utilizado foi o descrito por Bligh & Dyer (1959).

A 30 g de amostra triturada, adicionaram-se 150 mL de clorofórmio, 300 mL de metanol e 120 mL de água ultrapura. Homogeneizou-se com o Ultra turrax, a 8000 rpm durante 2 minutos. Seguiu-se uma agitação magnética por 30 minutos. Acrescentaram-se 150 mL de clorofórmio e 150 mL de uma solução de sulfato de sódio anidro 1,5 % (p/v). Agitou-se novamente, durante 2 minutos. Transferiu-se para uma ampola de decantação. Retirou-se a fase inferior, sendo posteriormente filtrada com um filtro Whatman nº4 com 1 g de sulfato de sódio anidro. Com um evaporador rotativo, evaporou-se o clorofórmio a 40 °C. A gordura foi armazenada a -80 °C.

### 3.6.5 Perfil de Ácidos Gordos

Foi utilizado um método de cromatografia gasosa para analisar os ácidos gordos presentes nas amostras de gordura de salmão.

Pesou-se 0,2 g de gordura de salmão e adicionaram-se 2,5 mL de *n*-hexano. Homogeneizou-se manualmente. De seguida, acrescentou-se 0,25 mL do reagente de transesterificação, o hidróxido de potássio e agitou-se. O tempo de reação é de 30 minutos. Foi utilizada para a determinação de ácidos gordos a fase superior da solução, sendo analisada no GC-FID. Em relação às condições cromatográficas utilizadas, a temperatura da coluna foi de 275 °C, o fluxo foi de 15,6 mL/min, em modo *split*, o gás de arraste foi o hélio e a rampa de temperatura do forno foi: 100 °C durante 0 minutos; 2 °C até 204 °C durante 15 minutos; 3 °C até 214 °C durante 10 minutos; 3 °C até 240 °C durante 16 minutos. O padrão utilizado para a determinação da mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos foi Supelco™ 37 Componente FAME Mix (Catálogo nº 47885-U).

### 3.6.6 Determinação do Índice de Peróxidos

A metodologia aplicada foi a do método Cd8-53, descrito pela Sociedade Americana de Químicos de Óleos (AOCS, do inglês *American Oil Chemists' Society*) (AOCS, 1989).

Para esta determinação foi necessária a preparação de uma solução saturada de iodeto de potássio, uma solução de tiosulfato de sódio 0,01 N e uma solução de amido de 10 mg/mL.

A 0,1 g de gordura de salmão, adicionaram-se 10 mL de isooctano, 15 mL de ácido acético e 1 mL da solução saturada de iodeto de potássio. Agitou-se manualmente. De seguida, conservou-se ao abrigo da luz por 5 minutos, à temperatura ambiente. Acrescentaram-se 3 mL da solução de amido e 75 mL de água ultrapura. Foi realizada uma titulação com a solução de tiosulfato de sódio, até que a amostra apresentasse cor branca. As amostras controlo foram constituídas apenas por reagentes.

A determinação do índice de peróxidos é dada pela equação 4.

$$PV (meqO_2/kg \text{ gordura}) = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{m} \quad (4)$$

Onde:

*S* – Volume de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto (mL)

*B* – Volume de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto no ensaio controlo (mL)

*N* – Normalidade do tiosulfato de sódio

$m$  – Massa da gordura (g).

### 3.6.7 Determinação do valor de $p$ -anisidina

Este método foi realizado de acordo com o BS 684-2.24 (1998).

Uma solução de 2,5 mg/mL de  $p$ -anisidina em ácido acético foi preparada.

A 0,5 g de gordura adicionou-se 25 mL de  $n$ -hexano. Mediu-se a absorvância da amostra num espectrofotómetro, a 350 nm, contra  $n$ -hexano. A 5 mL da amostra acrescentou-se 1 mL da solução de  $p$ -anisidina. A amostra controlo foi constituída por 5 mL de  $n$ -hexano e 1 mL da solução de  $p$ -anisidina. Seguiram-se 10 minutos em privação da luz, à temperatura ambiente. Finalmente, mediu-se a absorvância a 350 nm, contra a amostra controlo.

O valor de  $p$ -anisidina é calculado pela equação 5.

$$AV = \frac{25 \times (1,2Abs2 - Abs1)}{m} \quad (5)$$

Onde:

$AV$  – valor de  $p$ -anisidina

$Abs2$  – Absorvância da amostra depois de 10 minutos de reação

$Abs1$  – Absorvância inicial da amostra

$m$  – Massa da gordura (g).

### 3.6.8 Ensaio de TBARS

O procedimento foi realizado como descrito por D. Miller (1998).

Para este ensaio preparou-se uma solução de ácido ortofosfórico 0,02 M, uma solução de ácido tricloroacético a 10 % (p/v) em ácido ortofosfórico e uma solução de ácido tiobarbitúrico de 2,9 mg/mL. A 5 g de salmão triturado, adicionaram-se 50 mL da solução de ácido tricloroacético. Homogeneizou-se com Ultra turrax a 8000 rpm durante 2 minutos e filtrou-se com Whatman nº4. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um tubo de 15 mL, ao qual se acrescentou 5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico. Submeteram-se as amostras a 100 °C durante 40 minutos no bloco de aquecimento, posteriormente arrefeceram-se em gelo por 15 minutos. Por último, mediu-se a absorvância contra a amostra controlo, a 530 nm. As amostras controlo são constituídas de 5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico e 5 mL de água ultrapura, sendo sujeitas às mesmas condições.

Para a construção de uma curva de calibração foi utilizado o 1,1,3,3-tetrapentano como padrão, com concentrações entre 1 e 7 µg/mL. O resultado é dado em mg MDA/kg de amostra.

### 3.6.9 Ensaio do Hexanal

O método utilizado para preparar a amostra foi desenvolvido por Wen *et al.* (1997) e o procedimento usado para a identificação e quantificação do hexanal foi o método desenvolvido por Sanches-Silva *et al.* (2004).

Para este ensaio foi necessário a preparação de uma solução de 2,4-DNPH em ácido sulfúrico 30 % (v/v).

Para a extração do hexanal, pesaram-se 1,0 g da amostra de salmão triturado e adicionaram-se 5 mL da solução de 2,4-DNPH. Homogeneizou-se a solução com o Ultra Turrax a 8000 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi mantida por 4 horas protegida da luz, à temperatura ambiente.

De seguida, adicionou-se 10 mL de  $n$ -hexano, centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos a 15 °C e retirou-se o sobrenadante para um balão evaporador. Esta extração com  $n$ -hexano foi repetida 2 vezes.

Num evaporador rotativo, foi evaporado o *n*-hexano, a 35 °C e 70 mbar e redissolveu-se a amostra em 10 mL de metanol. Depois da filtração, seguiu-se a análise no UPLC®-DAD.

Relativamente às condições cromatográficas utilizadas para identificar e quantificar o hexanal, as fases móveis foram água ultrapura (Solvente A) e acetonitrilo (Solvente B) na proporção 25:75, em modo isocrático. As duas fases móveis foram sujeitas a desgaseificação e filtração durante 15 minutos. A coluna foi mantida a 20 °C, o fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção 10 µL. A identificação e quantificação do hexanal foi realizada a 365 nm e o tempo de retenção foi de  $0,95 \pm 0,1$  min. Todas as análises foram realizadas três vezes.

### 3.7 Questionário

Foi disponibilizado *online* um questionário com 26 questões sobre hábitos de consumo de alimentos em latas de conserva, sendo aplicado à população portuguesa no geral (Anexo III). O inquérito teve dois objetivos distintos: o levantamento dos hábitos de consumo e a avaliação do conhecimento da população sobre embalagens alimentares inovadoras.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Atividade Antioxidante *in vitro*

Para a avaliação e comparação da capacidade antioxidante dos extratos de chá verde e alecrim foram realizados quatro ensaios: o Sistema de inibição do radical livre DPPH•, o teste do branqueamento do β-caroteno, o ensaio de determinação dos fenólicos totais e o método de determinação dos flavonoides totais.

Os extratos de plantas aromáticas são obtidos a partir de partes das plantas, normalmente das folhas, através de um método de extração (Dai & Mumper, 2010).

Nos trabalhos de Costa (2013) e Reis (2014) foram comparados diferentes solventes de extração para o alecrim, entre eles, metanol e etanol. Através de métodos de avaliação de capacidade antioxidante, em ambos os estudos a conclusão foi que as amostras de alecrim extraídas com metanol apresentavam melhores resultados de poder antioxidante que as extraídas com etanol ou outro solvente.

Apesar das evidências a favor da utilização de metanol como solvente, este não foi escolhido para a obtenção de extratos de alecrim. A razão principal foi a sua elevada toxicidade, que pode conduzir a danos fatais quando ingerido por humanos (FDA, 2018a), o que não permite o seu uso para a incorporação no filme ativo edível, que é um dos objetivos deste estudo.

Em relação ao etanol, este foi escolhido como solvente de extração do alecrim devido a ser aceite pela FDA como GRAS, o que significa que a sua ingestão por humanos é considerada segura (FDA, 2018b). Dos solventes analisados por Costa (2013) e Reis (2014), o etanol foi o que apresentou melhores resultados de poder antioxidante para extratos de alecrim, a seguir ao metanol, demonstrando ser uma válida opção.

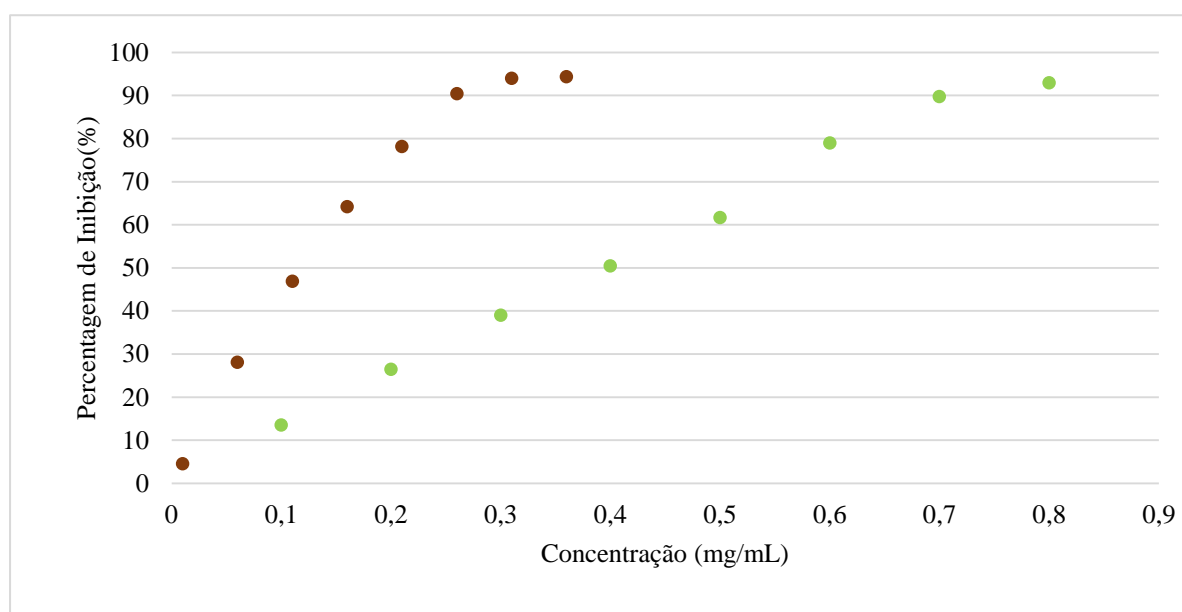
No caso do extrato de chá verde, as amostras foram já adquiridas sob a forma de extrato, pelo que não foi necessária a extração do mesmo.

O etanol foi também escolhido para dissolver os extratos de alecrim e chá verde, para a realização dos ensaios de avaliação da atividade antioxidante. Esta opção foi sustentada pela menor agressividade deste solvente em relação ao metanol. A única exceção foi o método do radical livre DPPH para o chá verde, onde foi utilizado o metanol para a dissolução do extrato. A razão desta escolha prendeu-se com o facto

do extrato de chá verde não se dissolver com facilidade em etanol e no ensaio do DPPH ser removida a ação das amostras controle, ou seja, os solventes, na fórmula do cálculo dos resultados finais.

#### 4.1.1 Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno

Para o cálculo da inibição do radical DPPH $\cdot$ , determinou-se a percentagem de inibição, e seguidamente calcularam-se os Equivalentes de Trolox (ET) para cada extrato, como demonstrado na Figura 4.1. e Tabela 4.1. O extrato de chá verde apresentou valores de aproximadamente 70 % de inibição do radical DPPH, para uma concentração de 0,2 mg/mL de extrato, enquanto o extrato de alecrim valores de aproximadamente 30 %, para a mesma concentração. Observou-se que a partir de 0,3 mg/mL existe uma saturação do poder antioxidante do extrato de chá verde, enquanto no extrato de alecrim esta saturação apenas ocorre aos 0,8 mg/mL.



**Figura 4.1.** Comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH $\cdot$  a amostras que continham extrato de chá verde e alecrim, de concentrações diferentes.

O extrato de chá verde apresentou valores de aproximadamente 80 e 130  $\mu$ g ET/mL, para concentrações de 0,1 e 0,2 mg/mL de extrato, respetivamente, enquanto o alecrim valores de aproximadamente 20 e 40  $\mu$ g ET/mL, para as mesmas concentrações de extrato. Desta forma, as amostras provenientes do extrato de chá verde possuíam valores superiores de inibição do radical DPPH, quando comparadas com as de alecrim.

**Tabela 4.1.** Resultados do ensaio do radical DPPH expresso em Percentagem de Inibição (%) e  $\mu$ g de Equivalentes Trolox por mL ( $\mu$ g ET/mL) (média  $\pm$  DP) para o Extrato de Chá Verde (ECV) e Extrato de Alecrim (EA). Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).

Concentração (mg/mL)	Ensaio do radical DPPH			
	Percentagem de Inibição (%)		$\mu$ g ET/mL	
	ECV	EA	ECV	EA
0.1	51.43 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	13.36 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	83.74 $\pm$ 3.73 <sup>A</sup>	22.02 $\pm$ 0.37 <sup>B</sup>
0.2	86.62 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	24.43 $\pm$ 0.38 <sup>d</sup>	133.41 $\pm$ 7.03 <sup>C</sup>	39.47 $\pm$ 0.59 <sup>D</sup>

Andrade (2016) obteve resultados de aproximadamente 140 µg ET/mL para três marcas diferentes de alecrim, onde todas as amostras apresentaram concentrações de 5 mg/mL, sendo estes valores de capacidade antioxidante, menores que os do presente trabalho. O solvente utilizado na extração do alecrim, no artigo consultado, foi o etanol.

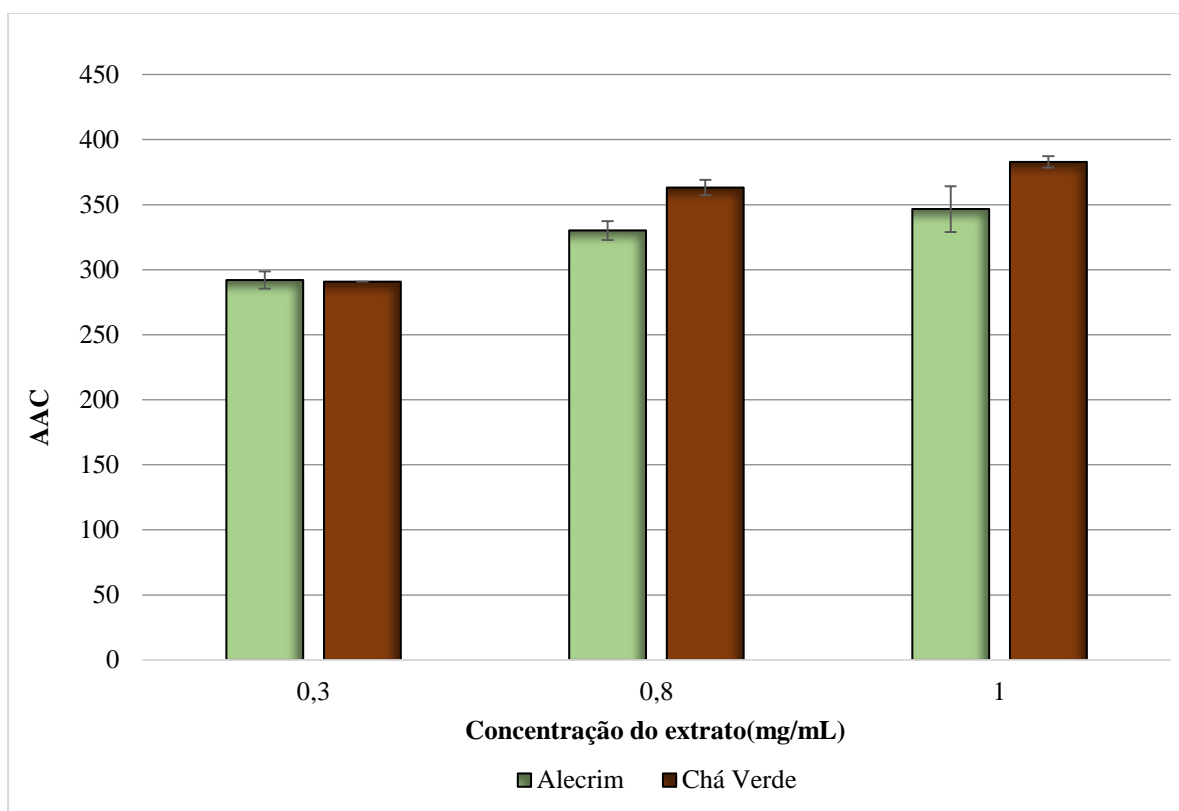
Observaram-se na literatura resultados expressos em µmol/g extrato (Bartoszek, Polak, & Chorążewski, 2018) ou em µmol ET/g extrato (Zhang, Suen, Yang, & Quek, 2017), que não são comparáveis ao presente trabalho.

O teste do branqueamento do β-caroteno é um ensaio amplamente utilizado pela comunidade científica para calcular o AAC (do inglês, *Antioxidant Activity Coefficient*). Tem como base, através da adição de compostos antioxidantes a uma emulsão de β-caroteno, a medição da capacidade destas substâncias em inibir a peroxidação lipídica, e dessa forma avaliar o poder antioxidante das amostras em estudo (Amarowicz, Pegg, Rahimi-Moghaddam, Barl, & Weil, 2004; Mikami, Yamaguchi, Shinmoto, & Tsushida, 2009).

Os resultados do ensaio do branqueamento do β-caroteno estão demonstrados na Figura 4.2. Observou-se uma superioridade da capacidade antioxidante das amostras provenientes do extrato de chá verde em relação às amostras de extrato de alecrim, sendo que apresentam maiores valores de AAC em duas das três concentrações em estudo. Quando comparadas, nas concentrações de 0,8 e 1.0 mg/mL, as amostras de chá verde registraram valores de coeficiente de atividade antioxidante de aproximadamente 360 e 380, enquanto o alecrim 330 e 345.

Martins (2018) realizou o teste do branqueamento do β-caroteno para amostras de chá verde de concentração 0,1 mg/mL, adquiridas em zonas comerciais, tendo obtido resultados de 918 AAC. Estes valores são muito superiores aos registrados no nosso estudo.

Andrade (2016) obteve valores de coeficiente de atividade antioxidante na ordem dos 1000 para amostras de alecrim de concentração 5 mg/mL, extraídas com etanol. Esta disparidade pode advir de diferenças nas condições edafoclimáticas, altura do ano da colheita e região das amostras de chá verde e de alecrim. No caso dos resultados de Andrade (2016), o facto de ter sido utilizada uma concentração superior à do nosso estudo pode ter potencializado a atividade antioxidante.



**Figura 4.2.** Comparação dos resultados do teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno em amostras de extrato de chá verde e alecrim. AAC – Coeficiente de Atividade Antioxidante.

#### 4.1.2 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais e em flavonoides totais

Na determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu existe uma mistura de ácidos de coloração amarela em meio alcalino. Ocorre a oxidação dos compostos fenólicos neste meio básico, com a formação de oxigênio. O oxigênio reage com os ácidos, formando-se uma solução de cor azul. Quanto maior for a intensidade da coloração, maior é a absorvância, e consequentemente o teor em compostos fenólicos (Rivelli, 2010).

Construiu-se uma reta de calibração para o ácido gálico, de forma a possibilitar a apresentação dos resultados sob a forma de equivalentes de ácido gálico (EAG).

Obteve-se uma curva com a equação  $y = 7,0004x - 0,0775$  e um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9993, para a gama de trabalho 0,025-0,150 mg/mL.

As amostras que continham o extrato de chá verde obtiveram valores mais elevados de EAG, quando comparadas com as de extrato de alecrim. Em ambos os casos, existiu uma relação direta entre a concentração do extrato na amostra e o potencial antioxidante (Tabela 4.2.).

O valor máximo que se obteve neste estudo foi de aproximadamente 443,55 mg EAG/g extrato de chá verde, enquanto para extratos de alecrim foi de 190,23 mg EAG/g extrato.

Kmiecik, Gramza-Michałowska, & Korczak (2018) obtiveram 198 mg EAG/g extrato, enquanto Lorenzo, Sineiro, Amado, & Franco (2014) 391 mg EAG/g extrato e Martins (2018) 416 mg EAG/g extrato para amostras de chá verde. Em relação a amostras de extrato de alecrim, Costa (2013) determinou o teor de compostos fenólicos para 4 amostras de alecrim, obtendo um valor médio de 100 mg EAG/g extrato para amostras com uma concentração de 5 mg/mL de extrato. A razão principal para esta diferença de valores pode residir nas concentrações de extrato nas amostras utilizadas para os



ensaios, em que no presente estudo foram de 0,1 mg/mL (valor máximo), e de 5 mg/mL nos restantes trabalhos.

**Tabela 4.2.** Comparação dos resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais em amostras que continham extrato de chá verde e alecrim, de concentrações diferentes. ECV – Extrato de Chá Verde; EA – Extrato de Alecrim. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ).

Concentração (mg/mL)	Conteúdo de Fenólicos (mg EAG/g extrato)		Conteúdo de Flavonóides (mg ECE/g extrato)	
	ECV	EA	ECV	EA
0,1	443,55 ± 10,00 <sup>a</sup>	190,23 ± 2,97 <sup>b</sup>	119,81 ± 11,70 <sup>a</sup>	118,69 ± 5,09 <sup>a</sup>
0,5	n.c.	n.c.	63,71 ± 2,69 <sup>b</sup>	107,68 ± 3,90 <sup>c</sup>

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos, quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica. Estes são metabolitos secundários das plantas, atuando como antioxidantes na presença de grupos OH livres (Erkan, Ayranci, & Ayranci, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2006).

O ensaio da determinação dos flavonoides totais baseia-se na formação de um complexo que envolve a reação do íon alumínio  $Al^{3+}$  com os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonoides. Esta reação confere uma coloração amarela à solução, que passa a vermelha em meio básico. A intensidade desta coloração é medida espectrofotometricamente, quantificando os compostos flavonoides presentes na amostra (Palacios *et al.*, 2011; Rivelli, 2010; Alvarez-Suarez *et al.*, 2009).

Para a construção da curva de calibração utilizou-se a epicatequina, o que permitiu a apresentação dos resultados em mg ECE (equivalentes de epicatequina)/g extrato. Obteve-se uma reta de equação  $y = 3,0021x + 0,0017$ , com um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9996 para uma gama de trabalho de 0,025-0,175 mg/mL.

Existiu, em concordância com os resultados dos compostos fenólicos totais, um aumento progressivo dos valores de mg ECE/g de amostra com o aumento da concentração dos extratos nas amostras. Foi também possível registar, como demonstrado na Tabela 4.2., que as amostras com a presença de extrato de alecrim obtiveram maiores níveis de flavonoides, por conseguinte, maior capacidade antioxidante quando comparadas com as amostras de chá verde.

Obtiveram-se valores máximos de 118,69 mg ECE/g extrato de alecrim e 119,81 mg ECE/g extrato de chá verde. Em comparação com a literatura, Martins (2018) apresentou resultados de 148 mg ECE/g extrato em amostras comerciais de chá verde, enquanto Costa (2013) realizou ensaios de determinação dos flavonoides totais em 4 amostras de alecrim, registando valores médios de aproximadamente 80 mg ECE/g extrato. As diferenças observadas podem resultar da menor concentração de ambos os extratos utilizados nas amostras do presente estudo, conduzindo a uma inferior quantidade de flavonoides presentes (0,5 mg/mL foi a concentração máxima neste trabalho, enquanto 5 mg/mL foi a utilizada para os ensaios realizados em ambos os estudos mencionados).

Compararam-se os resultados dos ensaios de determinação dos compostos fenólicos totais e dos flavonoides totais. Observou-se a presença de maior quantidade de compostos fenólicos nas amostras de extrato de chá verde em relação às de extrato de alecrim. Em relação aos flavonoides, registou-se o oposto, as amostras com extrato de alecrim possuem um maior teor de flavonoides que as amostras de extrato de chá verde.

### 4.1.3 Sinergia entre os Extratos

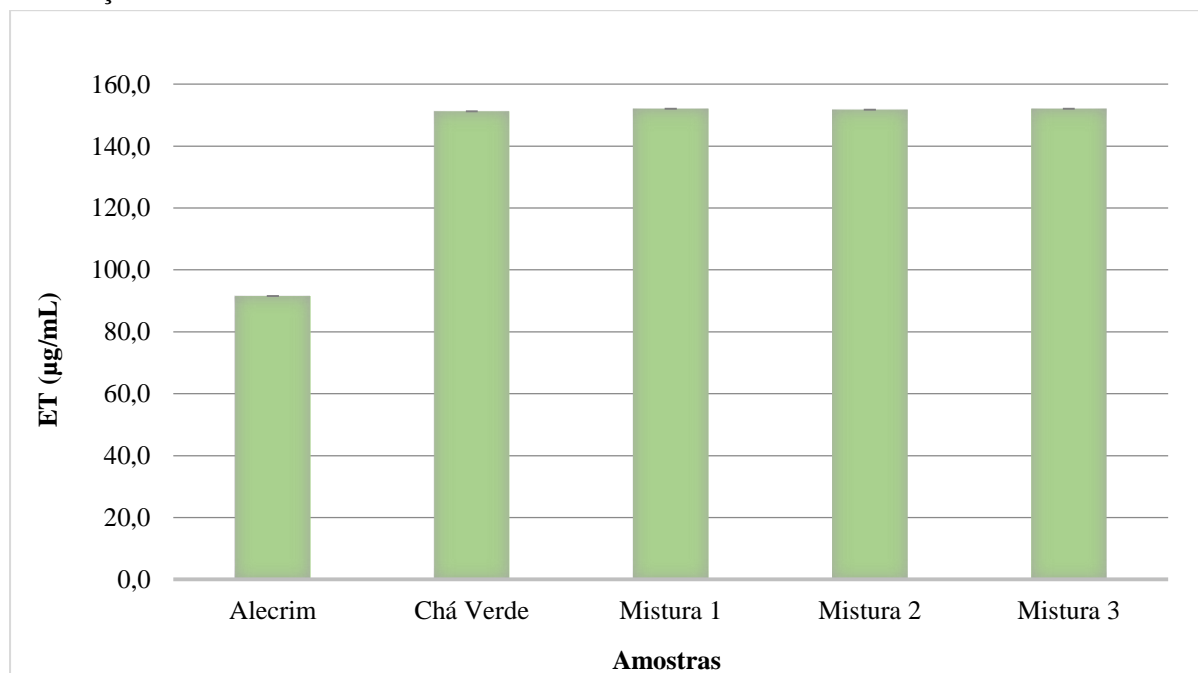
Decidiu-se verificar se o poder antioxidante dos extratos de alecrim e chá verde tinha um efeito sinérgico. Para tal, foram testadas três misturas e os extratos de alecrim e chá verde individualmente, como apresentado na Tabela 3.1. A mistura 1 era composta de 25 % de alecrim e 75 % de chá verde, enquanto a mistura 2 possuía 50 % de ambos os extratos. A concentração dos extratos foi de 0,8 mg/mL. Por último, a mistura 3 tinha como constituintes 75 % de alecrim e 25 % de chá verde. As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição do radical livre DPPH.

Perante os resultados apresentados na Figura 4.3, observou-se que a amostra com extrato de chá verde obteve resultados semelhantes de capacidade antioxidante (aproximadamente 150 µg ET/mL) que as três misturas, enquanto a amostra com extrato de alecrim apresentou um valor de aproximadamente 90 µg ET/mL. Desta forma, concluiu-se que não existe efeito sinérgico entre os extratos de chá verde e alecrim, o que sustenta a utilização dos extratos de forma individual.

De seguida procedeu-se ao cálculo da concentração necessária de extrato para captar 50 % do número de radicais livres DPPH presentes na solução, isto é, determina-se o EC<sub>50</sub> (do inglês, *Effective concentration*) dos extratos de chá verde e alecrim, pelo método de inibição do radical livre DPPH.

O EC<sub>50</sub> do extrato de chá verde obtido no presente trabalho foi de 0,10 mg/mL. Em comparação com a literatura, este valor foi semelhante ao obtido por Martins *et al.* (2018) (0,12 mg/mL) e Lorenzo *et al.* (2014) (0,12 mg/mL) para extratos de chá verde dissolvidos em etanol. Pode dizer-se que os diferentes solventes em que foram diluídos os extratos não tiveram influência nos resultados.

Em relação ao extrato de alecrim, o EC<sub>50</sub> foi de 0,43 mg/mL. Outros autores como Andrade *et al.* (2018) e Pereira *et al.* (2017) obtiveram valores de 0,38 mg/mL e 0,13 mg/mL, respetivamente, em extratos etanólicos de alecrim. No caso de Pereira *et al.*, o valor de EC<sub>50</sub> pode ter sido inferior devido à prévia liofilização do extrato.



**Figura 4.3.** Comparação dos resultados obtidos no ensaio do sistema de inibição do DPPH• a extratos individuais de chá verde e alecrim e a misturas. Mistura 1 - 25 % extrato de alecrim e 75 % extrato de chá verde; Mistura 2 - 50 % de extrato de alecrim e 50 % de extrato de chá verde; Mistura 3 - 75 % de extrato de alecrim e 25 % de extrato de chá verde. ET - Equivalentes Trolox.

Analisaram-se os resultados dos quatro testes de capacidade antioxidante, verificando-se que as amostras com extrato de chá verde obtiveram valores superiores de poder antioxidante que as de extrato

de alecrim, nos ensaios do radical DPPH,  $\beta$ -caroteno e compostos fenólicos totais. Apenas na determinação dos flavonoides totais o alecrim se superiorizou ao chá verde.

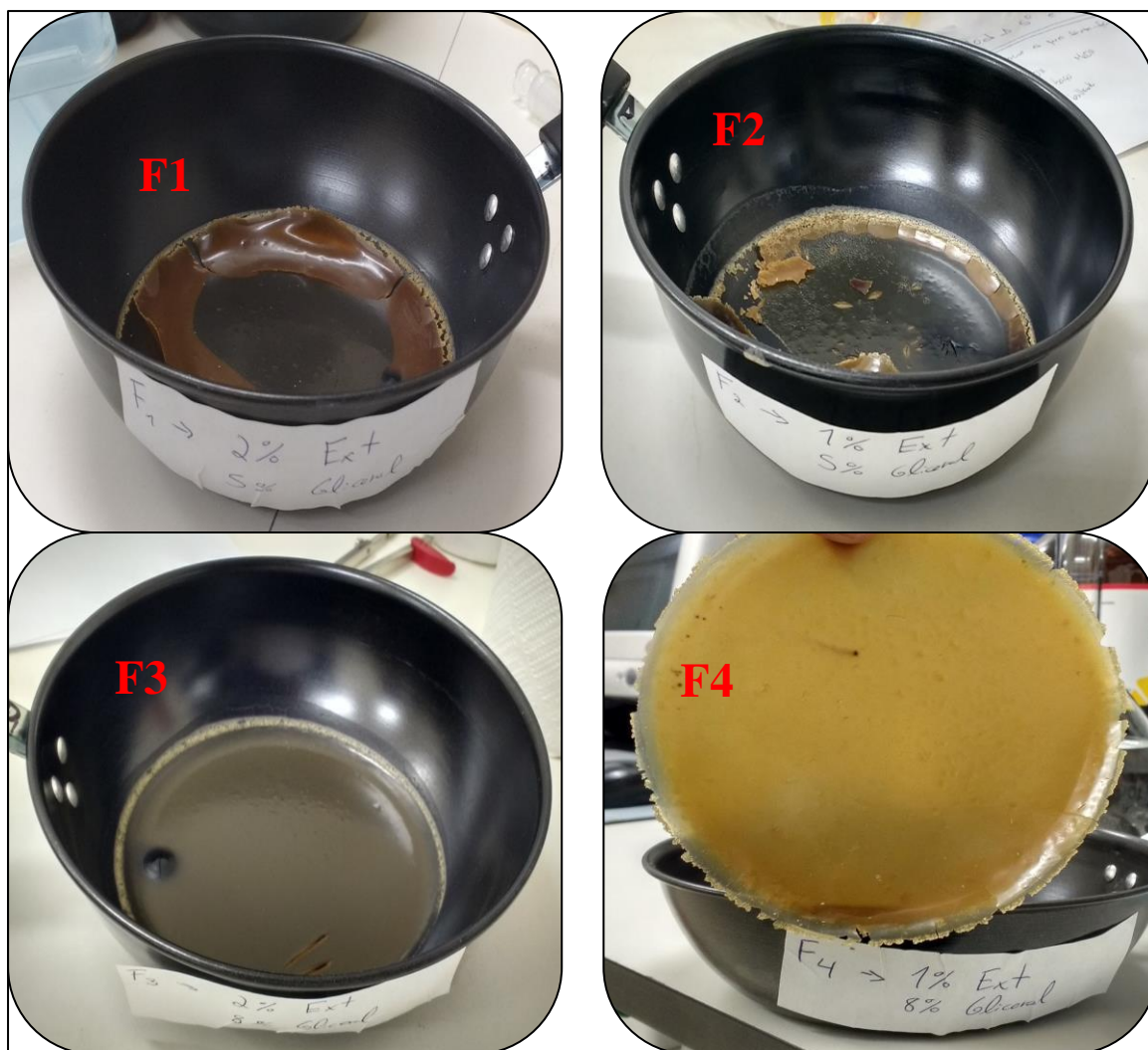
Observou-se que o extrato de chá verde registou um valor de  $EC_{50}$  (0,10 mg/mL) inferior ao do alecrim (0,43 mg/mL), o que também é indicador de um maior potencial antioxidante.

Perante estes resultados, decidiu-se optar pelo extrato de chá verde para incorporar os filmes à base de proteína de soro de leite.

## 4.2 Desenvolvimento da Embalagem Ativa

### 4.2.1 Otimização da incorporação do glicerol e do extrato de Chá Verde

Os filmes ativos preparados neste trabalho, como vimos anteriormente, são constituídos por WPC, água, glicerol e extrato de chá verde. A escolha do glicerol como plastificante, prende-se com o fato de este ser uma molécula com baixo peso molecular e de natureza hidrofílica, o que facilita a sua incorporação em matrizes proteicas, como é o caso do presente trabalho. Acrescenta ainda, o fato da presença do glicerol tornar os filmes resultantes mais flexíveis, extensíveis e resistentes (Kowalczyk & Baraniak, 2011). Neste sentido, na obtenção de filmes eficazes e eficientes, a percentagem de incorporação do glicerol e a percentagem de incorporação de extrato de chá verde, devem ser otimizadas. As diferentes combinações de percentagem entre o glicerol e o extrato de chá verde a testar, foram selecionadas com base nos resultados obtidos por Andrade *et al.* (2018), Assim sendo, testaram-se quatro filmes distintos: Filme 1 (F<sub>1</sub>) - 2 % de extrato de chá verde e 5 % de glicerol; Filme 2 (F<sub>2</sub>) - 1 % de extrato de chá verde e 5 % de glicerol ; Filme 3 (F<sub>3</sub>) - 2 % de extrato de chá verde e 8 % de glicerol e Filme 4 (F<sub>4</sub>)- 1 % de extrato de chá verde e 8 % de glicerol, como apresentado na Figura 4.4.



**Figura 4.4.** Otimização da incorporação de glicerol e extrato de chá verde no filme ativo. F1 - 2 % de extrato e 5 % de glicerol; F2 - 1 % de extrato e 5 % de glicerol; F3 - 2 % de extrato e 8 % de glicerol; F4 - 1 % de extrato e 8 % de glicerol.

De acordo com os resultados obtidos, temos: o  $F_1$  e o  $F_2$  apresentaram-se quebradiços. O  $F_3$ , apresentava uma textura pastosa, havendo dificuldades na separação do mesmo da superfície de Teflon. Por último, o  $F_4$ , mostrou-se homogéneo, resistente e flexível, não havendo dificuldades na remoção do mesmo da superfície de Teflon, nem apresentando deterioração da sua estrutura.

Com base nestes resultados foram selecionadas as percentagens do  $F_4$  (1 % de extrato de chá verde e 8 % de glicerol) para prosseguir com os restantes ensaios.

Foi observada uma diferença entre as faces do filme, sendo a superior brilhante e a inferior baça. Este facto pode dever-se à deposição dos constituintes do filme, face à força da gravidade, acumulando-se na parte inferior.

### 4.3 Avaliação do estado de oxidação lipídica do alimento modelo embalado em filmes ativos

#### 4.3.1 Identificação de ácidos gordos

O consumo de alimentos ricos em ácidos gordos polinsaturados tem sido associado à diminuição da presença de doenças cardiovasculares, obesidade ou cancro. Desta forma, a determinação da

composição de ácidos gordos permite a identificação dos alimentos cujo consumo é benéfico para a saúde humana. O método mais utilizado é o de cromatografia gasosa acoplado a um detetor FID, sendo os resultados representados num cromatograma (Cascañt *et al.*, 2017; Petrovic, 2010).

Foram determinados os valores dos ácidos gordos presentes no salmão fresco com 0, 5, 7 e 10 dias de armazenamento a 4 °C, no salmão que esteve embalado com filme controlo 0 % durante 5 e 7 dias, respetivamente e no salmão que esteve embalado com filme ativo 1 % durante 5 e 7 dias, respetivamente (Tabela 4.3.).

**Tabela 4.3.** Percentagem de ácidos gordos presentes no salmão fresco, salmão embalado com filme controlo 0%, salmão embalado com filme ativo 1 % e na Tabela de Composição de Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no site do PortFIR, respetivamente.

Percentagem de ácidos gordos em g/100g de amostra									
	Salmão fresco				Salmão embalado com filme controlo 0 %		Salmão embalado com filme ativo 1 %		TCAP (2018)
	0 dias	5 dias	7dias	12 dias	5 dias	7 dias	5 dias	7 dias	
Saturados	4,0	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	4.2
Monoinsaturados	8,9	9,5	9,7	9,7	9,7	9,8	9,6	9,7	10
Polinsaturados	8,0	7,6	7,6	7,6	7,6	7,5	7,6	7,6	5.1
dos quais n3:	2,3	1,7	1,4	1,4	1,5	1,3	1,5	1,5	-
dos quais n6	5,5	5,8	6,0	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9	-
<i>trans</i>	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	-
<b>TOTAL de ácidos gordos</b>	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9	20.9

Na Tabela 4.3. o valor de ácidos gordos saturados resulta do somatório  $\Sigma$  (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C21:0 + C24:0), o valor de ácidos gordos monoinsaturados resulta do somatório  $\Sigma$  (C14:1 + C16:1c + C17:1c + C18:1 + C20:1 + C24:1) e o valor de ácidos gordos polinsaturados resulta do somatório  $\Sigma$  (C18:2c(n6) + C18:3c(n3) + C18:3c(n6) + C20:4(n6) + C22:2 + C22:5(n3) + C22:6(n3)).

Como podemos verificar os valores de ácidos gordos presentes no salmão fresco estão de acordo com a literatura consultada (TCAP, 2018). Analisando os valores de ácidos gordos do salmão fresco ao longo do tempo, com os valores do salmão quando embalado com filme controlo e com filme ativo no mesmo período de armazenamento, 5 e 7 dias respetivamente, podemos verificar que não existem alterações significativas, levando a supor que não existiu qualquer degradação dos ácidos gordos ao longo dos tempos de armazenamento. Isto pode ser explicado pelo curto tempo de armazenamento a que as amostras foram sujeitas, sendo que possivelmente a partir dos 30 dias de armazenamento poder-se-iam encontrar sinais de degradação dos ácidos gordos

Cascañt *et al.*, (2017) utilizaram cromatografia gasosa para identificar ácidos gordos em salmão, obtendo a presença de ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolénico com as maiores concentrações. Estes valores são coerentes com os do presente estudo.

Petrovic, (2010) identificou ácidos gordos presentes em atum por cromatografia gasosa, obtendo níveis elevados de expressão de ácido palmítico e ácido oleico.

No que diz respeito a estudos que avaliassem a degradação dos ácidos gordos ao longo do tempo, após uma ampla pesquisa não foram encontrados trabalhos comparáveis ao presente estudo.

### 4.3.2 Determinação do Índice de peróxidos

Os peróxidos e hidroperóxidos são o resultado da oxidação primária de óleos e gorduras. A quantificação destes compostos numa amostra pode ser feita através do índice de peróxidos, método muito utilizado na avaliação do estado oxidativo da gordura de uma amostra (Mehta *et al.*, 2015). Os resultados são expressos em meq O<sub>2</sub>/kg.

No ensaio de determinação do índice de peróxidos, observou-se que o valor de peróxidos nunca foi superior a 3,28 meq O<sub>2</sub>/kg, quer para o salmão fresco durante todo o seu período de armazenamento (0-17 dias) quer para as amostras embaladas em filme ativo (com 1 % de extrato de chá verde), filme controlo (sem chá verde incorporado) ou não embaladas.

Em amostras de salmão fresco não embaladas, o valor mais elevado de peróxidos foi 3,28 meq O<sub>2</sub>/kg, correspondente aos 5 dias. Após este período, as únicas amostras de salmão fresco com valores diferentes de zero (1,63 meq O<sub>2</sub>/kg) corresponde ao período dos 10 dias. No que diz respeito às amostras embaladas em filme ativo e controlo, não foram registados peróxidos em nenhuma das condições.

Ju *et al.* (2018) obtiveram valores progressivos de peróxidos ao longo do tempo de armazenamento. Observaram 1,5 a 5 meq O<sub>2</sub>/kg em amostras não embaladas e 1,5 a 3,8 meq O<sub>2</sub>/kg em amostras embaladas em filme ativo. Martins *et al.* (2018), por sua vez, realizaram um trabalho com salmão fumado embalado num filme ativo com extrato de chá verde incorporado, onde os valores registados de peróxidos não ultrapassaram os 5 meq O<sub>2</sub>/kg. O valor mais elevado foi determinado aos 30 dias de armazenamento, quer para o filme controlo (sem chá verde incorporado), quer para os filmes ativos (1 % e 2 % de extrato de chá verde). Similarmente a este presente trabalho, os níveis de peróxidos não se apresentaram progressivos ao longo do tempo.

A diminuição dos níveis de peróxidos a partir dos 5 dias pode ser explicada pela possível taxa de deterioração dos hidroperóxidos ter sido superior à sua produção, visto que com o desenvolvimento da oxidação lipídica, ocorre a decomposição dos peróxidos em produtos secundários, ou a sua reação com outros compostos presentes nos alimentos (Bou, Codony, Tres, Decker, & Guardiola, 2008).

Em relação ao salmão fumado, o salmão fresco tem uma oxidação lipídica mais rápida, não necessitando de períodos de armazenamento tão extensos como os de Martins *et al.* (2018) para obter resultados válidos de oxidação. Esta foi a razão da escolha do salmão fresco em detrimento do salmão fumado.

### 4.3.3 Ensaio de TBARS

O ensaio de TBARS é dos mais aceites e utilizados na avaliação do estado de oxidação lipídica nos alimentos. Este quantifica a existência de MDA, o principal aldeído produzido durante a decomposição dos ácidos gordos insaturados em hidroperóxidos, na oxidação primária (D. Miller, 1998; Osawa *et al.*, 2005).

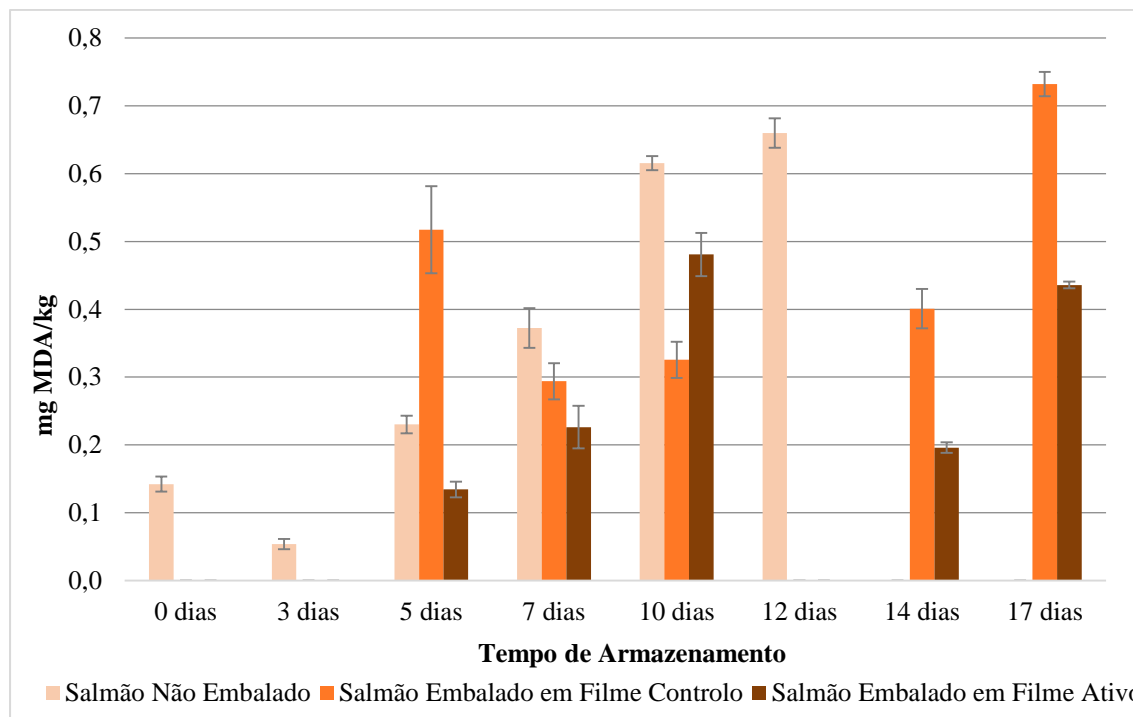
A Figura 4.5. descreve os resultados obtidos por este método para amostras de salmão fresco não embalado, embalado com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com 1 % de extrato de chá verde).

Analisando os resultados, observou-se que todas as amostras embaladas com os filmes ativos, em todos os tempos de armazenamento, apresentaram níveis de MDA inferiores às amostras embaladas com o filme controlo, com exceção do tempo de armazenamento de 10 dias.

Relativamente aos resultados do salmão fresco não embalado, observou-se que o pico do ciclo natural da oxidação lipídica é aos 12 dias de armazenamento, onde é registado aproximadamente 0,7 mg MDA/kg de amostra. Os resultados deste ensaio, sugerem que o extrato de chá verde incorporado no filme ativo teve sucesso na inibição da oxidação lipídica do salmão fresco.

Soyer (2018) adicionou extrato de chá verde a amostras de cavala do Atlântico (*Scomber scombrus*) numa concentração de 100 mg de extrato/kg de amostra e armazenou-as a -18 °C por um período de 6

meses, sendo analisadas mensalmente. O ensaio de TBARS demonstrou um aumento de MDA ao longo do tempo, em todas as amostras, mas comparando as que foram submetidas ao extrato de chá verde com as amostras controlo, os níveis de MDA foram inferiores nas primeiras. Chegou-se à conclusão que o extrato de chá verde na concentração de 100 mg de extrato/kg de amostra retarda o processo de oxidação lipídica na cavala do Atlântico.



**Figura 4.5.** Resultados do ensaio de TBARS para amostras de salmão fresco não embaladas, embaladas com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com 1% de extrato de chá verde). MDA – Malonaldeído.

Ju *et al.* (2018) embalaram amostras de achigã (*Micropterus salmoides*) num filme com polifenóis de chá verde incorporado, e armazenaram-nas por 18 dias a 4 °C. O estado de oxidação lipídica foi analisado pelo ensaio de TBARS, onde foram registados valores de 0,78 mg MDA/kg em amostras armazenadas durante 18 dias, embaladas a vácuo em contacto com polifenóis de chá verde. Para amostras embaladas sem o contacto de chá verde durante o mesmo tempo de armazenamento obtiveram-se valores de aproximadamente 1,3 mg MDA/kg de amostra. Perante os resultados obtidos, verificou-se que o contacto com polifenóis de chá verde demonstrou ser eficaz no atraso da oxidação lipídica de achigã.

Martins *et al.* (2018) investigaram o efeito de um filme ativo à base de ácido polilático (PLA) com extrato de chá verde em salmão fumado, tendo armazenado as amostras ao abrigo da luz, a 5 °C, durante 60 dias. Foi realizado o ensaio de TBARS, com o objetivo de avaliar o estado da oxidação lipídica. Em comparação com as amostras embaladas em filme controlo (sem extrato de chá verde incorporado), as amostras de salmão fumado embaladas em filme ativo (com extrato de chá verde) apresentaram valores de MDA/kg inferiores. Assim, foi possível concluir que o filme ativo teve eficácia no atraso da oxidação lipídica.

#### 4.3.4 Determinação do valor de *p*-anisidina

O valor de *p*-anisidina mede a presença de aldeídos (subprodutos da oxidação secundária), cuja formação ocorre durante a decomposição dos peróxidos, numa amostra de gordura ou óleo. A *p*-anisidina reage com os aldeídos, resultando na produção de compostos de coloração amarela. Quanto

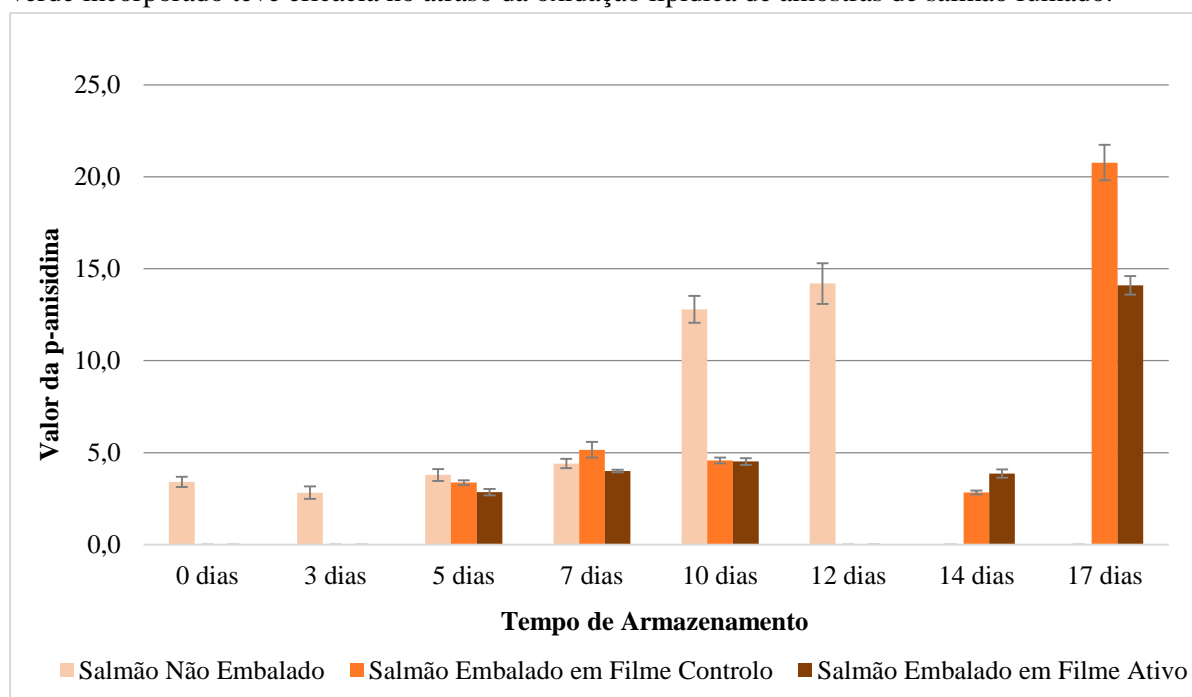
maior for a intensidade da cor amarela, maior é a quantidade de aldeídos, e consequentemente mais avançado é o estado da oxidação lipídica da amostra (Guo *et al.*, 2016)

A Figura 4.6. apresenta os resultados obtidos por este método para amostras de salmão fresco não embalado, embalado com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com 1 % de extrato de chá verde).

Em análise aos resultados, observou-se que todas as amostras embaladas com o filme ativo apresentaram valores de *p*-anisidina inferiores às amostras embaladas com o filme controlo, com a exceção das amostras armazenadas durante 14 dias.

Em relação ao salmão fresco não acondicionado, registou-se o valor máximo do ciclo natural da oxidação lipídica aos 12 dias de armazenamento, onde foi registado um valor de *p*-anisidina de aproximadamente 14. Os resultados deste teste sugerem que o filme ativo com extrato de chá verde incorporado teve sucesso na inibição da oxidação lipídica do salmão fresco.

Martins *et al.* (2018) estudaram o efeito de um filme ativo à base de ácido polilático (PLA) com extrato de chá verde em salmão fumado, armazenando as amostras ao abrigo da luz, a 5 °C, durante 60 dias. Foi realizado a determinação do valor de *p*-anisidina com o objetivo de avaliar o estado da oxidação lipídica. Em comparação com as amostras embaladas em filme controlo (sem extrato de chá verde incorporado), as amostras de salmão fumado embaladas em filme ativo (com extrato de chá verde) apresentaram valores de *p*-anisidina inferiores. Assim, concluiu-se que o filme ativo com extrato de chá verde incorporado teve eficácia no atraso da oxidação lipídica de amostras de salmão fumado.



**Figura 4.6.** Resultados da determinação do valor da *p*-anisidina para amostras de salmão fresco não embaladas, embaladas com o filme controlo (sem extrato de chá verde) e com o filme ativo (com extrato de chá verde incorporado).

#### 4.3.5 Ensaio do Hexanal

Os principais compostos voláteis que resultam da oxidação lipídica dos alimentos são os aldeídos. Estes são derivados da decomposição dos peróxidos (produtos primários) no processo oxidativo, e estão relacionados com as alterações organoléticas dos alimentos, e por conseguinte perda de qualidade nutricional. O hexanal é um dos principais aldeídos, sendo que a sua presença nos alimentos é considerada um indicador da oxidação lipídica (Ross & Smith, 2006; A. Sanches-Silva *et al.*, 2004).



Numa análise geral, verificou-se que o hexanal não foi detetado em nenhuma das amostras de salmão fresco, quer embalado em filme controlo, filme ativo ou não embalado.

Comparando o ciclo de oxidação lipídica natural do salmão fresco e o ciclo de oxidação lipídica do salmão fresco embalado com o filme controlo e ativo verifica-se que era suposto ser detetado hexanal nas fatias de salmão fresco em contato com o filme controlo e no entanto, esse facto não se verificou. Estes resultados sugerem que o hexanal encontra-se em pouca quantidade no salmão, indicando que o seu embalamento o protege da oxidação lipídica.

Os resultados deste ensaio não permitem concluir acerca da atividade protetora dos filmes ativos com extrato de chá verde em relação ao filme controlo, no entanto, na literatura, estudos relatam a eficácia do extrato face à oxidação lipídica, através da determinação do hexanal.

O estudo realizado por Alghazeer *et al.* (2008), referido anteriormente para o ensaio de TBARS, também analisou a formação de hexanal em cavala do Atlântico com extrato de chá verde adicionado diretamente ao alimento, nas concentrações de 250 e 500 mg/kg. Os resultados do ensaio do hexanal foram semelhantes aos resultados obtidos para o ensaio de TBARS, indicados no ponto anterior. Os autores verificaram que os níveis de hexanal aumentaram, significativamente, após 16 semanas de armazenamento, na amostra controlo (sem adição de extrato de chá verde) armazenada a -10 °C em relação à amostra com 250 mg/kg de extrato de chá verde incorporado, armazenada à mesma temperatura, mostrando que, a adição de extrato de chá verde ao alimento atrasou o processo de oxidação lipídica (Alghazeer *et al.*, 2008).

## 4.4 Ensaio de Migração

Um dos maiores desafios da indústria das embalagens alimentares é a monitorização da migração de compostos para os alimentos, perante a sua possível toxicidade (Bhunia *et al.*, 2013). O Regulamento (CE) n° 10/2011 disponibiliza uma lista de compostos que podem ser utilizados na manufatura de plásticos destinados ao contato com alimentos, e para determinadas substâncias existem limites de migração específicos. Assim, os ensaios de migração são fundamentais para a manutenção da qualidade do acondicionamento e para assegurar a segurança do consumidor (Comissão Europeia, 2004; Ribeiro dos Santos, 2016).

No que diz respeito ao conceito de embalagens ativas, a interação entre a embalagem e o alimento é desejada, e um dos mecanismos de ação tem como base a migração de compostos ativos da embalagem para o alimento. Através de testes de migração, pode ser avaliado o potencial de migração dos compostos ativos, tendo em conta condições de temperatura, tempo, concentração do migrante e do tipo de polímero (Bhunia *et al.*, 2013). Em relação ao processo de migração dos compostos ativos para a matriz alimentar, vários fatores podem ter efeito, como a composição da amostra (por exemplo o teor de gordura), a hidratação do filme, a temperatura, a espessura do filme e a solubilidade entre o migrante e o alimento ou simulador alimentar (Ribeiro dos Santos, 2016).

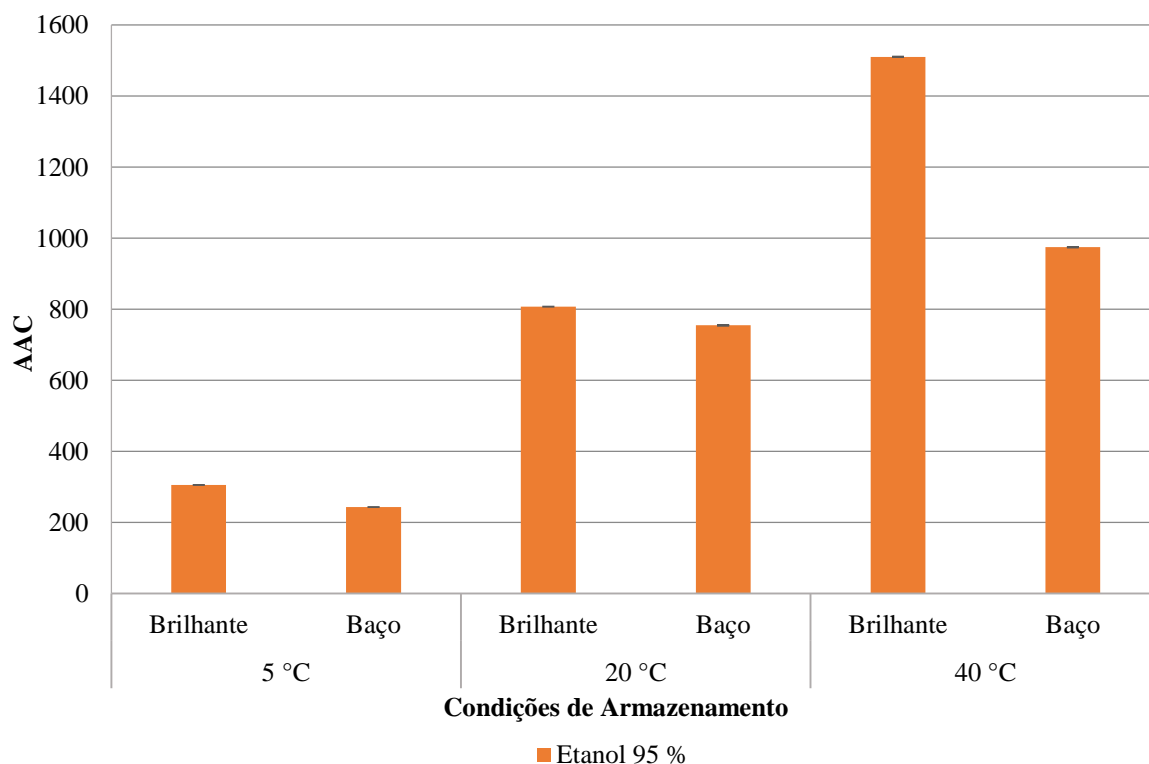
Os simuladores alimentares representam as principais propriedades físico-químicas dos alimentos, e têm um comportamento semelhante ao de um grupo de alimentos de características similares. De acordo com o Regulamento (UE) n° 1416/2016, o etanol a 95 % pode ser utilizado como simulador alimentar para alimentos gordurosos com alto teor lipídico (Comissão Europeia, 2016).

Para realizar os testes de migração na embalagem ativa com extrato de chá verde, foi realizado um ensaio onde o filme ativo foi colocado em contato com o simulador alimentar etanol a 95 % (v/v). Foi também utilizado o metanol de grau analítico, um solvente com elevado poder de extração de compostos biológicos (Murugan & Parimelazhagan, 2014), para possibilitar a comparação dos resultados. De seguida, realizaram-se 2 ensaios de avaliação da capacidade antioxidante: Sistema de inibição do DPPH e branqueamento do  $\beta$ -caroteno.

#### 4.4.1 Sistema de inibição do radical DPPH e teste do branqueamento do $\beta$ -caroteno

O simulador alimentar, etanol a 95 %, que esteve em contato com o filme ativo com extrato de chá verde durante 10 dias, obteve valores na ordem dos 153  $\mu\text{g ET/mL}$ , para o teste do radical livre DPPH. Foi também observado que para todas as condições de temperatura (5, 20 ou 40°C) ou lado do filme em contato (face baça ou brilhante), todas as amostras apresentaram valores semelhantes.

Como descrito em 4.1.1 (atividade antioxidante *in vitro*), no ensaio do radical livre DPPH o extrato de chá verde obteve valores de aproximadamente 151  $\mu\text{g ET/mL}$  para concentrações entre 0,3 e 1,0 mg/mL de extrato. Estes valores são superiores em relação aos níveis obtidos pelo filme, com a concentração de extrato de chá verde de 1 %, ou seja, 10 mg/mL.



**Figura 4.7.** Comparação dos resultados do teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, entre o simulador etanol 95 % e o solvente metanol, em amostras sujeitas a condições de armazenamento diferentes: temperatura (5, 20 ou 40 °C) e face do filme ativo (brilhante ou baça).

No que diz respeito ao teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno para amostras em contato com o filme ativo, foram observados valores de Coeficiente de Atividade Antioxidante superiores em amostras sujeitas a temperaturas mais elevadas, e cuja face do filme em contato tenha sido a brilhante. O valor máximo foi de aproximadamente 1500 AAC (Figura 4.7).

Os resultados do teste do  $\beta$ -caroteno para o extrato de chá verde, descrito em 4.1.1 (atividade antioxidante *in vitro*), apresentaram um valor máximo de aproximadamente 382 AAC para a concentração de 1,0 mg/mL de extrato. Os níveis de AAC do extrato de chá verde foram inferiores quando comparados com o filme ativo. Uma possível razão pode ter sido a concentração de extrato de 10 mg/mL, na embalagem.

Concluiu-se que em condições de temperatura superiores a 20 °C, existe um maior índice de migração dos compostos ativos do filme para o simulador alimentar (Ribeiro dos Santos, 2016), obtendo níveis mais elevados de capacidade antioxidante. Em relação ao simulador alimentar, e ao contrário do

esperado derivado do alto poder de extração de compostos do metanol (Murugan & Parimelazhagan, 2014), o etanol a 95 % obteve valores mais altos de capacidade antioxidante, possivelmente devido a uma maior afinidade com os compostos biológicos, que conduz a uma maior taxa de migração. Por último, observou-se que a face brilhante do filme ativo registou valores mais altos de AAC do que a face baça. Desta forma, foi escolhida a face brilhante (superior) para estar em contato com as amostras de salmão, aquando do acondicionamento, de modo a maximizar a migração.

## 4.5 Questionário

Foi elaborado um questionário *online* com dois objetivos distintos: avaliar os hábitos de consumo de uma amostra da população portuguesa, relativamente a alimentos em conserva, e aferir o conhecimento de uma amostra da população portuguesa acerca de embalagens ativas e inteligentes. Foram obtidas 314 respostas.

### 4.5.1 Hábitos de consumo relativamente a alimentos em conserva

Os materiais destinados a estar em contacto com os alimentos, são uma excelente barreira para com as adversidades externas a que o alimento pode estar sujeito, contudo estes materiais podem interagir com os alimentos. A interação embalagem-alimento é um fenómeno que pode ocorrer por adsorção, permeabilidade e/ou migração. Dependendo do material usado e da forma como é empregue, são inúmeros os compostos que podem migrar para o alimento (van der Kellen, 2017).

A grande maioria das latas metálicas utilizadas para embalar alimentos apresentam um revestimento interno para proteger o alimento do metal e vice-versa. Este revestimento consiste num material epóxi-fenólico que tem por base BPA e epicloridrina (Coulier *et al.*, 2010). A reação entre estes dois compostos forma uma resina de baixo peso molecular pré-polimerizada, onde se inclui o BADGE (Coulier *et al.*, 2010).

O objetivo desta primeira secção do questionário *online*, foi avaliar os hábitos de consumo relativamente a alimentos de conserva por parte de uma amostra da população portuguesa, e o conhecimento acerca do que é a substância BADGE e da sua origem.

Procedeu-se, de seguida, à análise estatística dos dados.

### 4.5.2 Conhecimento acerca de embalagens ativas e inteligentes

O objetivo desta segunda secção do questionário *online* foi avaliar o conhecimento da população portuguesa sobre embalagens alimentares, nomeadamente ativas e inteligentes.

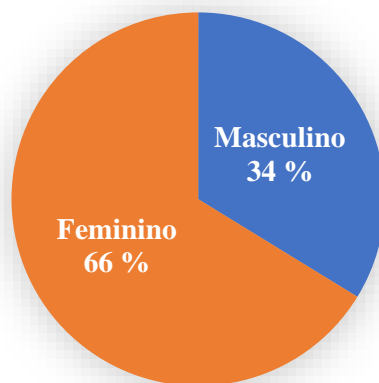
As embalagens alimentares convencionais têm como função a proteção de fatores externos que alteram as propriedades sensoriais dos alimentos, a qualidade nutricional e a segurança microbiológica. Estas embalagens tradicionais retardam a deterioração natural dos alimentos, apesar de não combaterem a oxidação. Um dos seus pressupostos para garantir a segurança dos consumidores é a não interação entre o material de acondicionamento e o produto alimentar, de forma a evitar a modificação do alimento pelo material da embalagem. Nos últimos anos houve por parte da indústria tecnológica das embalagens uma melhoria no acondicionamento e o desenvolvimento de novos mecanismos de combate à oxidação natural dos alimentos, originando novos conceitos de embalagens: as embalagens ativas e inteligentes (Brody, Bugusu, Han, Sand, & McHugh, 2008; Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008; Paseiro *et al.* 2007)

As embalagens ativas têm como propósito a interação com o alimento, quer através da libertação de compostos pela embalagem (embalagens emissoras) quer através da absorção de substâncias do meio envolvente (embalagens absorventes), podendo manter ou melhorar a qualidade organoléptica dos

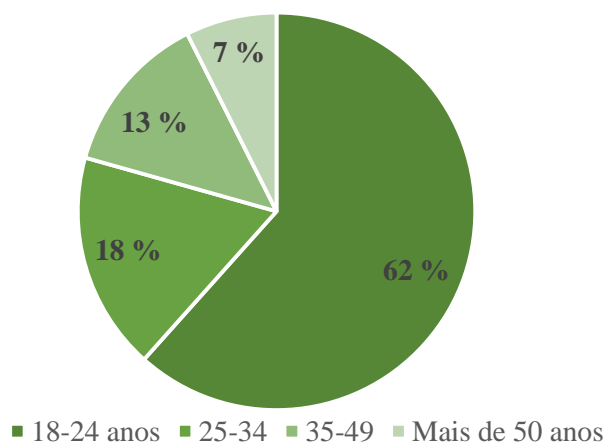
produtos e eventualmente prolongar o seu tempo de vida útil (Brody *et al.*, 2001; Comissão Europeia, 2004; Dainelli *et al.*, 2008)

Por outro lado, as embalagens inteligentes têm a função de monitorizar as condições do alimento acondicionado ou as condições do meio ambiente, por exemplo a temperatura. Os sistemas inteligentes podem ter uma barreira funcional a separá-los do alimento embalado, de forma a não haver a libertação dos seus constituintes para a matriz alimentar (Comissão Europeia, 2009; Dainelli *et al.*, 2008).

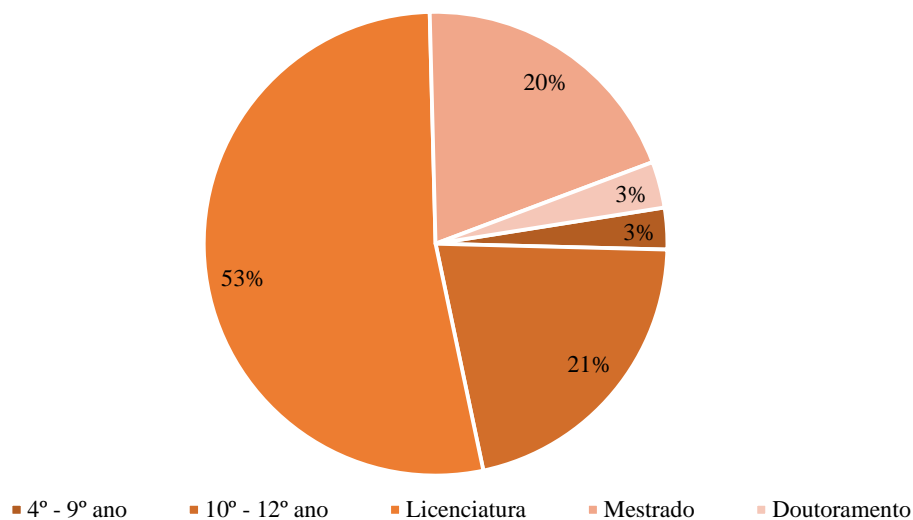
Procedeu-se de seguida, à análise estatística dos dados, onde a maioria dos inquiridos era do género feminino, entre os 18 e os 24 anos de idade, e com um nível de escolaridade superior (Figuras 4.8., 4.9. e 4.10.).



**Figura 4.8.** Distribuição percentual do género dos inquiridos (n=314).



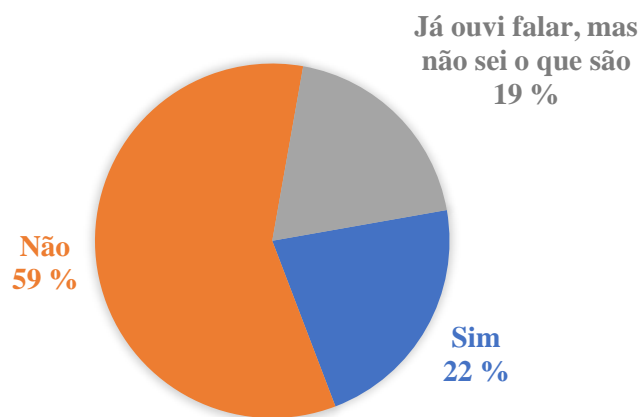
**Figura 4.9.** Distribuição percentual das idades dos inquiridos (n=314).



**Figura 4.10.** Distribuição percentual do nível de escolaridade dos inquiridos (n=314).

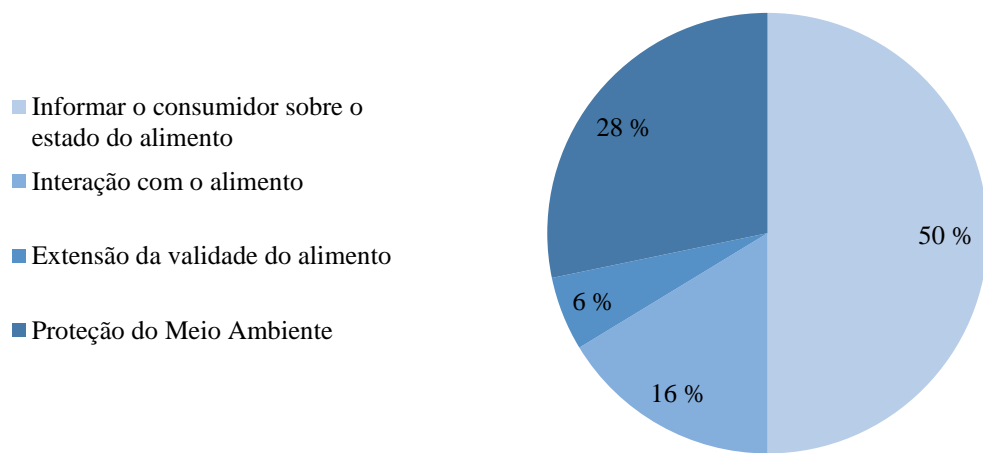
### 4.5.3 Resultados do questionário

Quando questionados acerca das embalagens inteligentes, 59 % dos inquiridos responderam que nunca tinham ouvido falar nem sabiam do que se tratava, 22 % já tinham ouvido falar e sabiam do que se tratava enquanto 19 % dos inquiridos, já tinham ouvido falar, mas não sabiam a que se referiam este tipo de embalagens. (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Distribuição percentual da resposta à pergunta “Sabe o que são embalagens inteligentes?” (n=314).

Apenas os inquiridos, que responderam saber o que eram embalagens inteligentes, avançaram para a nova fase de questões. Destes, 50 % sabiam que a função principal destas embalagens é informar o consumidor sobre o estado do alimento (Figura 4.12).

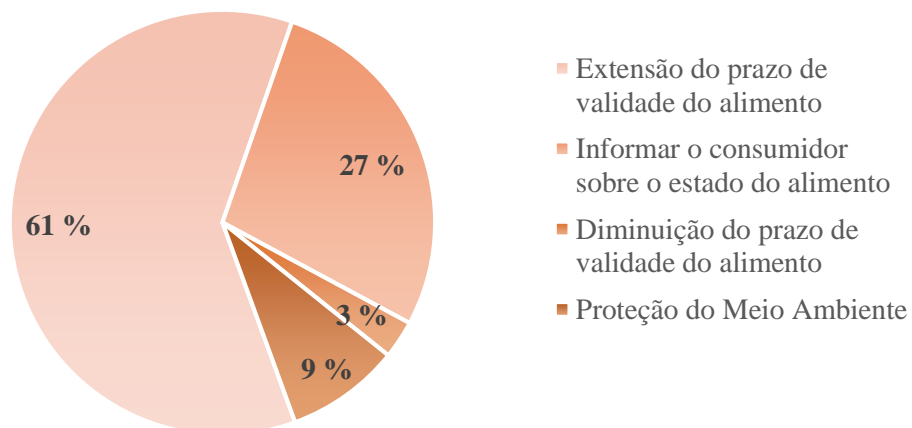


**Figura 4.12.** Distribuição percentual da resposta à pergunta “Qual a função principal das embalagens inteligentes?” (n=314).



**Figura 4.13.** Distribuição percentual da resposta à pergunta “Sabe o que são embalagens ativas?” (n=314).

Quando colocada a questão sobre o seu conhecimento das embalagens ativas, 75 % dos inquiridos responderam que nunca tinham ouvido falar, 18 % sabiam do que se tratava e 8 % dos inquiridos já tinham ouvido falar, mas não sabiam a que se referiam este tipo de embalagens. (Figura 4.13).



**Figura 4.14.** Distribuição percentual da resposta à pergunta “Qual a função principal das embalagens ativas?” (n=314).

Somente os inquiridos que afirmaram saber o que eram embalagens inteligentes na questão anterior, avançaram para a nova fase de perguntas. Destes, 61 % sabiam que a função principal destas embalagens é a extensão do prazo de validade do alimento (Figura 4.14).

## 4.6 Revisão Bibliográfica de BPA e BADGE

Nesta secção, fez-se uma revisão bibliográfica referente aos métodos cromatográficos utilizados na determinação de BPA e BADGE em materiais em contato com matrizes alimentares.

No total foram reunidos 15 artigos científicos, com data de publicação entre 2003 e 2018, onde foram apresentados diversas técnicas e métodos de deteção e determinação, tais como: GC, LC (do inglês, *Liquid Chromatography*), HPLC e UHPLC (do inglês, *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) acoplados a vários tipos de detetores: FL (do inglês, *Fluorescence*), MS, MS/MS e UV (Ultravioleta). As referências selecionadas referem-se a materiais como: plástico, latas de conserva e vidro. Foi avaliada a migração de BPA e BADGE em alimentos como pescado, carne, bebidas energéticas, tomates, leite, batatas, ervilhas, milho, refeições “prontas a comer”, sumos de frutas, pudim, pickles, feijões, cogumelos, pimentos, mel e simuladores de alimentos.

A informação obtida, em resultado da revisão bibliográfica, encontra-se agrupada nas Tabelas 8.1. e 8.2. A primeira resume os métodos cromatográficos e as suas condições para determinar BPA e BADGE, e a segunda tem em consideração o tipo de material em contato com os alimentos.

Em suma, concluiu-se que nesta revisão bibliográfica o método mais utilizado para determinar o BPA foi o HPLC, enquanto o método mais frequente para identificar e quantificar o BADGE foi o UHPLC. No que diz respeito ao material testado, os mais frequentes entre os estudos foram as latas metálicas. Em relação ao alimento ou simulador alimentar, amostras de atum foram as mais utilizadas. Em todos os trabalhos existiu migração de BPA ou BADGE para os alimentos, mas em todos os casos abaixo dos limites estabelecidos pelas entidades reguladoras.

## 5 Conclusão

Os objetivos propostos foram concluídos com sucesso. Os resultados obtidos pelos quatro ensaios de capacidade antioxidante (sistema de inibição do radical livre DPPH, teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, determinação dos fenólicos e flavonoides totais) determinaram a escolha do extrato etanólico de chá verde em relação ao extrato de alecrim para a incorporação do filme à base de proteína de soro de leite. Foi também avaliado o efeito sinérgico entre os extratos de chá verde e alecrim, pela comparação da capacidade antioxidante dos extratos individuais, com misturas dos extratos de chá verde e alecrim, sendo que através do teste do radical livre DPPH foi escolhido o extrato de chá verde individual.

Posteriormente, o processo de produção do filme ativo à base de proteína de soro de leite foi otimizado, sendo testadas diferentes concentrações de glicerol (plastificante) e do extrato ativo. As percentagens que obtiveram os melhores resultados foram 8 % (p/p) de glicerol e 1 % (p/p) de extrato de chá verde. De seguida, o filme ativo à base de proteína de soro de leite foi avaliado quanto à sua eficácia na diminuição da oxidação lipídica de um alimento com alto teor de gordura, o salmão fresco. Para esse efeito, foram realizados quatro testes (índice de peróxidos, determinação do valor de p-anisidina, ensaio de TBARS e monitorização do hexanal). Os ensaios do índice de peróxidos e do hexanal mostraram-se inconclusivos, enquanto o valor de p-anisidina e o teste de TBARS permitiram concluir que o filme ativo (com extrato de chá verde) foi eficaz no atraso da oxidação lipídica de amostras de salmão fresco até aos 10 dias de armazenamento, em comparação com o filme controlo (sem extrato de chá verde).

No que diz respeito aos resultados do questionário, foi observado que população portuguesa consome um elevado número de produtos em latas de conserva, nomeadamente o atum, apesar de poucos inquiridos possuírem conhecimento sobre a migração de bisfenóis para os alimentos. Em relação às embalagens alimentares inovadoras, verificou-se que uma pequena fração da população portuguesa tem conhecimento sobre as funções das embalagens inteligentes e ativas.



## 6 Perspetivas Futuras

São necessários outros trabalhos de forma a ser otimizada a produção da embalagem ativa à base de proteína de soro de leite com extrato de chá verde. Para melhor avaliar a sua eficácia na diminuição da oxidação lipídica de alimentos com alto teor de gordura, deverão ser realizados mais ensaios de determinação do estado oxidativo, durante períodos de armazenamento mais extensos.

Poderão ser testadas as propriedades mecânicas da embalagem, como as propriedades de barreira, à permeabilidade do oxigénio e humidade, bem como efetuar uma avaliação microbiológica a bactérias como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, de forma a ser quantificado o tempo de vida útil que a inibição da oxidação lipídica adiciona ao alimento. Para uma eventual comercialização, será necessária uma análise sensorial de um painel de provadores, para verificar se existem alterações das características organolépticas das amostras.

Em relação ao conhecimento da população portuguesa sobre a migração de compostos químicos das latas de conserva para os alimentos e sobre embalagens ativas e inteligentes, deverá ser realizada uma divulgação da informação sobre estes temas, de modo a aumentar o grau de conhecimento da mesma.

## 7 Referências

- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120(1–2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.056>
- Alvarez-Suarez, J. [et al.] (2009) - Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 5 (2009), 293–302.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4)
- Andrade, M. A. (2016). Embalagem Alimentar Ativa à base de Proteína de Soro de Leite com Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas : Desenvolvimento , Segurança e Eficácia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M. C., Saraiva, M., & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *LWT*, 92, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.041>
- AOCS. (1989). Official methods and recommended practices. *American Oil Chemists' Society*.
- Arvanitoyannis, I. S., & Bosnea, L. (2004). Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(2), 63–76. <https://doi.org/10.1080/10408690490424621>
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Kamali, A., Ojagh, S. M., & Abdollahi, M. (2014). Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1251–1258. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12086>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Baptista, J. A. B., Tavares, F. P., & Carvalho, R. C. B. (1999a). Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC / SPME-GC, *Food Research International*, 31(10).
- Baptista, J. A. B., Tavares, J. F. P., & Carvalho, R. C. B. (1999b). Comparative Study and Partial Characterization of Azorean Green Tea Polyphenols, *Journal of Food Composition and Analysis*, 287.
- Baptista, J., Lima, E., Paiva, L., Andrade, A. L., & Alves, M. G. (2012). Comparison of Azorean tea theanine to teas from other origins by HPLC / DAD / FD . Effect of fermentation , drying temperature , drying time and shoot maturity, *Food Chemistry*, 132, 2181–2187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.050>
- Barata, A. M., Rocha, F., Lopes, V., & Carvalho, A. M. (2016). Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. *Industrial Crops and Products*, 88, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.035>
- Barbonetti, A., Castellini, C., Di Giammarco, N., Santilli, G., Francavilla, S., & Francavilla, F. (2016). In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction. *Reproductive Toxicology*, 66, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.09.014>
- Bartoszek, M., Polak, J., & Chorążewski, M. (2018). Comparison of antioxidant capacities of different types of tea using the spectroscopy methods and semi - empirical mathematical model, *European Food Research Technology*, 595–601. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2986-z>
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1535–1543. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1535>

- Berset, C., Cuvelier, M.-E. (Auteur de correspondance) (1996). Revue: méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, 16, 219-245
- Bhunja, K., Sablani, S. S., Tang, J., & Rasco, B. (2013). Migration of chemical compounds from packaging polymers during microwave, conventional heat treatment, and storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 523-545.
- Bligh, & Dyer. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, pág 37.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH•free radical method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation – xylenol orange method : A review of the factors that influence the method ' s performance, *Analytical Biochemistry*, 377, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.029>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants : Sources , Compounds , Mechanisms of Action , and Potential Applications R: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., & McHugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*, 73(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x>
- Brody, A. L., Strupinsky, E. R., & Kline, L. R. (2001). *Active packaging for food applications*.
- BS 684-2.24. (1998). Methods of analysis of fats and fatty oils. Other methods. Determination of anisidine value. *British Standard Institute*, 11.
- Calucci, L., Pinzino, C., Zandomenighi, M., Capocchi, A., Ghiringhelli, S., Saviozzi, F., Galleschi, L. (2003). Effects of  $\gamma$ -irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 927–934. <https://doi.org/10.1021/jf020739n>
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Carrizo, D., Taborda, G., Nerín, C., & Bosetti, O. (2016). Extension of shelf life of two fatty foods using a new antioxidant multilayer packaging containing green tea extract. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.018>
- Cascant, M. M., Breil, C., Fabiano-tixier, A. S., Garrigues, S., & Guardia, M. De. (2017). Determination of fatty acids and lipid classes in salmon oil by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.158>
- Chen, F., Wang, C., Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Ye, J., & Chu, Q. (2014). Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection. *Talanta*, 119, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.052>
- Chen, J., Cai, D., & Zhang, Y. (2016). Rapid determination of lipid peroxidation using a novel pyridoxamine-participating ferrous oxidation-sulfosalicylic acid spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 211, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.106>
- Chua, L. S., Latiff, N. A., & Mohamad, M. (2016). Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide enriched extract. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.01.004>
- Coles R, McDowell D, Kirwan MJ (eds) (2003) Food Packaging Technology. Blackwell Publishing Ltd
- Comissão Europeia. (2004). Regulamento (CE) n° 1935/2004. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 4–17.
- Comissão Europeia. (2009). Regulamento (UE) n°450/2009. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- Comissão Europeia. (2010a). Directiva n° 2010/67/UE. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 277, 17–26.
- Comissão Europeia. (2010b). Directiva n° 2010/69/UE. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 22–31.
- Comissão Europeia. (2011). Regulamento (UE) n° 10/2011 da Comissão. *Jornal Oficial Da União*

*Europeia*, L(12), 1–89.

Comissão Europeia. (2016). Regulamento (UE) nº 1416/2016 da Comissão. *Jornal Oficial Da União Europeia*

Costa, D. (2013). Embalagens activas com propriedades antioxidantes : desenvolvimento de um método analítico e avaliação da segurança alimentar Denise Ninete de Carvalho da Costa Embalagens activas com propriedades antioxidantes : desenvolvimento de um método analítico e a.

Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 336–354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>

Coulier, L., Bradley, E. L., Bas, R. C., Verhoeckx, K. C. M., Driffield, M., Harmer, N., & Castle, L. (2010). Analysis of Reaction Products of Food Contaminants and Ingredients: Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) in Canned Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4873–4882. <https://doi.org/10.1021/jf904160a>

Cruz, J. M., Conde, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chemistry*, 100(3), 1059–1064. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.012>

Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of Eucalyptus globulus wood. *Food Chemistry*, 90(4), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.018>

Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 645–652. <https://doi.org/10.1007/BF02518121>

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, 19(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011>

Daly, T., Jiwan, M. A., O'Brien, N. M., & Aherne, S. A. (2010). Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their Bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), 164–169. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0167-3>

Dinnies Santos, R. (2009). Centro de Ciências Agrárias Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos Compostos Fenólicos de Ervas *Lamiaceae* na Toxicidade do Extrato de Alecrim *Rosmarinus* (Londrina – PR).

Duarte, M. R., & Menarim, D. O. (2006). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(4), 545–551.

Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea, 12, 404–421.

Dumbravă, D., & Moldovan, C. (2012). Vitamin C , chlorophylls , carotenoids and xanthophylls content in some basil (*Ocimum basilicum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves extracts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 18(3), 253–258.

Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058>

Fay, C., Barton, M., Craig, S., Hecht, A., Pruden, J., Saunders, R., Trial, J. (2006). Status Review for Anadromous Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in the United States, (July), 294. Retrieved from <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/statusreviews.htm%5Cn2>

Ferrari, C. K. B. (1998). Oxidação Lipídica em Alimentos e Sistemas Biológicos: Mecanismos Gerais e Implicações Nutricionais e Toxicológicas, 11(1), 3–14.

Figueiredo AC & Barroso JG, Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal. 3:106-136 (2007).

Food And Drug Administration (2018) Substances GRAS in food. In: 21 CFR 182. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text>

idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5. Acedido a 15 Jun 2018

- Genena, A. K. (2005). Extração e Caracterização do Extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. *Dissertação* da Universidade de Florianópolis, Santa Catarina.
- Gomes, S. (2010). Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica. Universidade de Coimbra, Mestrado em Química.
- Gonçalves, D. (2010). Cromatografia em camada delgada acoplada a voltametrias ciclica e de pulso diferencial na análise de ácido rosmarínico de *Rosmarinus officinalis* Linné (Alecrim), Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 1–82.
- González-trujano, M. E. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents, *Journal of Ethno-Pharmacology*, *111*, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.011>
- Gray, J. I. (1978). Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *55*(6), 539–546. <https://doi.org/10.1007/BF02668066>
- Guo, Q., Gao, S., Sun, Y., Gao, Y., Wang, X., & Zhang, Z. (2016). Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. *Industrial Crops & Products*, *94*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.032>
- Hamilton, R. J. [et al.] (1997) - Chemistry of free radicals in lipids. "Food Chemistry" *60* (1997) 193–199.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., & Guerrero Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, *81*(2), 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.09.004>
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Brunton, N. P. (2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*, *126*(1), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.076>
- Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, *71*(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00161-8)
- Ibanez, a L. K., Kubatova, Ä., Senorans, F. J. A. S., Cavero, S. O. C., Reglero, G. U. R., & Hawthorne, S. T. B. H. (2003). Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from, *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry*, 375–382. <https://doi.org/10.1021/JF025878J>
- Ibañez, E., Cifuentes, a, Crego, a L., Señoráns, F. J., Cavero, S., & Reglero, G. (2000). Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(9), 4060–4065. <https://doi.org/10.1021/jf0002692>
- Ju, J., Liao, L., Qiao, Y., Xiong, G., Li, D., & Wang, C. (2018). LWT - Food Science and Technology The effects of vacuum package combined with tea polyphenols (V + TP) treatment on quality enhancement of weever (*Micropterus salmoides*) stored at 0 ° C and 4 ° C. *LWT - Food Science and Technology*, *91*(October 2017), 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.056>
- Kalia, K. A. K., Harma, K. A. S., Ingh, H. A. P. R. S., & Ingh, B. I. S. (2008). Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC, *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry*, 10129–10134.
- Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., & Korczak, J. (2018). Anti-polymerization activity of tea and fruits extracts during rapeseed oil heating. *Food Chemistry*, *239*, 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.025>
- Koleva, I. (2007). New methods for the screening of antioxidants in three *Sideritis* species. University of Wageningen, Netherlands.
- Koşar, M., Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, *91*(3), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.029>
- Kowalczyk, D., & Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, *105*(2), 295–305.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.037>

Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4), 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.011>

Lidon, F.; Silvestre, M. - *Indústrias Alimentares – aditivos e tecnologia*. Lisboa: Escolar Editora, 2007. ISBN: 9789725922033.

Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.010>

Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R., & Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties, *Meat Science*, 96, 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.007>

Luzio, A., Monteiro, S. M., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A. A., & Coimbra, A. M. (2016). Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 $\alpha$ -ethinylestradiol and fadrozole). *Aquatic Toxicology*, 175, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.014>

Márquez-Ruiz, G. (2008). Changes and Effects of Dietary Oxidized Lipids in the Gastrointestinal Tract, 11–19.

Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 9(2), 136–156.

Martins, C. (2018). Filme ativo com extrato de chá verde na preservação de alimentos suscetíveis à oxidação lipídica. Filme ativo com extrato de chá verde na preservação de alimentos suscetíveis à oxidação lipídica. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Martins, C., Vilarinho, F., Sanches, A., Andrade, M., Machado, A. V, Castilho, M. C. Ramos, F. (2018). Industrial Crops & Products Active poly(lactic acid) film incorporated with green tea extract: Development, characterization and effectiveness, 123(February), 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.056>

Máthé, Á., 2009. Medicinal and aromatic plants. *Soils, plant growth and crop production. Encyclopedia of Life Support Systems. Disponible en línea en: [http://www.eolss.net/Sample-Chapters C, 10](http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C,10).*

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282.

Mehta, B. M., Darji, V. B., & Aparnathi, K. D. (2015). Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. *Food Chemistry*, 185, 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.023>

Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523–530.

Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H., & Tsushida, T. (2009). Development and Validation of a Microplate-based  $\beta$ -carotene Bleaching Assay and Comparison of Antioxidant Activity (AOA) in Several Crops Measured by  $\beta$ -carotene Bleaching, DPPH and ORAC Assays. *Food Science and Technology Research*, 15(2), 171–178. <https://doi.org/10.3136/fstr.15.171>

Miller, D. (1998). *Food Chemistry: A Laboratory Manual*. (2nd ed.). Wiley, 2017.

Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(2), 91–91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>

Moderno, P. M.; Carvalho, M.; Silva, B. M. (2009) - Recent patents on *Camellia sinensis*: source of health promoting compounds. *Recent patents on food, nutrition & agriculture* 1 (2009) 182–92.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International*, 34(2–3), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00136-8)

Murugan, R., & Parimelazhagan, T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for

antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. - An *in vitro* approach. *Journal of King Saud University - Science*, 26(4), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.09.006>

Ndhlala, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15(10), 6905–6930. <https://doi.org/10.3390/molecules15106905>

Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>

Nerín, C., Tovar, L., & Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.027>

Ngarize, S., Adams, A., & Howell, N. (2005). A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.008>

Norma Portuguesa NP 904 (1987). Gorduras e óleos comestíveis: determinação do índice de peróxidos. CT39 (IQA). Lisboa: IPQ.

Norma Portuguesa NP 1819 (1984). Gorduras e óleos comestíveis. Determinação do índice de panisidina. Lisboa: IPQ.

Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447–463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)

Obolskiy, D., Pischel, I., Feistel, B., Glotov, N., & Heinrich, M. (2011). Artemisia dracunculus L. (tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11367–11384. <https://doi.org/10.1021/jf202277w>

Osawa, C. C., De Felício, P. E., & Gonçalves, L. A. G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, 28(4), 655–663. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400019>

Ozdikicierler, O., & Pazir, F. (2014). The effects of spray drying process parameters on the characteristic process indices and rheological powder properties of microencapsulated plant (*Gypsophila*) extract powder. *Powder Technology*, 253, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.12.004>

Özen, B. Ö., & Soyer, A. (2018). Effect of plant extracts on lipid and protein oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince during frozen storage. *Journal of food science and technology*, 55(1), 120–127.

Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., ... Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.085>

Paseiro Losada P, Sanches-Silva A, Pereira de Abreu D, Cruz JM, Active and intelligent food packaging. In *Aplicación de Tecnologías Emergentes de Procesado Mínimo en el Sector Pesquero* 1:221-233 (2007).

Pelegri, D. H., & Gasparetto, C. A. (2003). Estudo Da Solubilidade Das Proteínas Presentes No Soro De Leite E Na Clara De Ovo. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 5(1), 57–65. <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v5n1p57-65>

Pereira, D., Pinheiro, R. S., Heldt, L. F. S., Moura, C. de, Bianchin, M., Almeida, J. de F., ... Carpes, S. T. (2017). Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Science and Technology*, 37(suppl 1), 17–23. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.31816>

Pereira de Abreu, D. A., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277–1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.019>

Perez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf000615f>

- Pérez Gutiérrez, R. O. S. A., Hernández Luna, Heliodoro, & Hernández Garrido, Sergio (2006). Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(2), 883-886.
- Petrović, M., Kezić, N., & Bolanča, V. (2010). Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry*, 122(1), 285-291.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S. G., Eaglesham, E., Zu, Y., Wu, N. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Molecules*, 15(5), 47-50. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(93\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0926-6690(93)90010-7)
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001). Antioxidants in food: practical applications. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- Poole, A., van Herwijnen, P., Weideli, H., Thomas, M. C., Ransbotyn, G., & Vance, C. (2004). Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE). *Food Additives and Contaminants*, 21(9), 905-919. <https://doi.org/10.1080/02652030400007294>
- Prior, R., Wu, X., & Kschaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Proestos, C., Sereli, D., & Komaitis, M. (2006). Food Chemistry Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chemistry*, 95, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.016>
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em leos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quimica Nova*, 29(4), 755-760. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>
- Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Xavier Malcata, F. (2014). Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. *Food Research International*, 66, 344-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.036>
- Reis, A. R. (2014). Estudo de compostos bioativos e vitaminas de plantas aromáticas e sua aplicação em embalagens alimentares activas. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Reusch, W. (2013). Virtual Text of Organic Chemistry: Visible and Ultraviolet Spectroscopy.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 355-368. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>
- Ribeiro dos Santos, R. (2016). *Development of protein active film incorporated with combination of essential oils: characterization and effectiveness*. Federal University of Rio de Janeiro.
- Rivelli, D. (2010) Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado. São Paulo, 2010. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo
- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants , fruit and vegetables, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1000).
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., & Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115(2), 456-461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.029>
- Ross, C. F., & Smith, D. M. (2006). Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 18-25. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00077.x>
- Ruiz Del Castillo, M. L., Blanch, G. P., & Herraiz, M. (2004). Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.055>
- Samotyja, U., & Małacka, M. (2007). Food Chemistry Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidant stability of bulk and emulsified lipid substrates, 104, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.046>
- Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 374-395. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215>
- Sanches-Silva, A., Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P.



- (2004). Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046(1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.101>
- Sanches Silva, A., Cruz Freire, J. M., Franz, R., & Paseiro Losada, P. (2008). Time-temperature study of the kinetics of migration of diphenylbutadiene from polyethylene films into aqueous foodstuffs. *Food Research International*, 41(2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.007>
- Sanches Silva, A., Franz, R., Freire, J. M. C. R. U. Z. F., Sendon, R. S., & Losada, (2009). Migration and Diffusion of Diphenylbutadiene from Packages into Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10225–10230. <https://doi.org/10.1021/jf901666h>
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. a., & Saura-calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 270(199802), 270–276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9)
- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 275–280.
- Scorletti, E., & Byrne, C. D. (2013). Omega-3 Fatty Acids , Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Annual Reviews*, 231–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161230>
- Shahidi, F., Wanasundara, U.N. - Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. In: Akoh CC, Min DB (eds) *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3rd edition, New York: CRC Press, 2008, ISBN: 978-1-4200-4663-2. p. 387–403.
- Shahidi, F., Zhong, Y. - Lipid Oxidation: Measurement Methods. In: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005, ISBN: 9780471678496.
- Simal-Gándara, J., Paz-abuín, S., Ahrné, L., Simal-gándara, J., Paz-abuín, S., & Ahrné, L. (2010). A Critical Review of the Quality and Safety of BADGE-Based Epoxy Coatings for Cans : Implications for Legislation on Epoxy Coatings for Food Contact A Critical Review of the Quality and Safety of BADGE-Based Epoxy Coatings for Cans : Implications for Legi, 8398(July 2016), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408699891274345>
- Sousa, C. M. D. M., Rocha, H., Vieira-jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, L. S., Araújo, D. S., Moore, M. H. E. (2007). *Quim Nova*, 30(2), 351–355.
- Spáčil, Z., Nováková, L., & Solich, P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, 76(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.021>
- St. Angelo, A. J., Vercellotti, J., Jacks, T., & Legendre, M. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(3), 175-224.
- Tabela de Composição de Alimentos Portuguesa. PortFIR. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.. Disponível online: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?434>. [Acedido a 22 de julho de 2018]
- Thøgersen, J. (1996). Wasteful food consumption: Trends in food and packaging waste. *Theme: Towards Green Business Systems*, 12(3), 291–304. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0956-5221\(96\)00011-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0956-5221(96)00011-5)
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26 April, 2018. Nutrient Data Laboratory. [Acedido a 22 de julho de 2018]. Disponível online: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/469011?manu=&fgcd=&ds=&q=FRESH%20&%20EASY,%20SALMON,%20UPC:%205051379029050>
- Valones, M.A.A. (2008). Avaliação da Actividade Antimicrobiana in vitro do dentríficio à base de extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) sobre cepas padrão de *S. Mutans*, *S. Aureus* e *L. Casei*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco.
- van der Kellen, A. M. P. (2017). Desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de ultra resolução acoplado a um detetor de fluorescência para determinação de bisfenol A em alimentos embalados. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia.
- Wei, G., & Ho, C. (2006). Food Chemistry A stable quinone identified in the reaction of carnosol , a

major antioxidant in rosemary , with 2 , 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, 96, 471–476.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.041>

Wei Zheng, & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, (September 2000). <https://doi.org/10.1021/JF010697N>

Wen, J., Morrissey, P. A., Walton, J., & Sheehy, P. J. A. (1997). Rapid and quantitative determination of hexanal in cooked muscle foods. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 36(1), 75–84.

Wheeler, D. S.; Wheeler, W. J. (2004) - The Medicinal Chemistry of Tea. "Drug Development Research" 61 (2004) 45–65

Xie, X., Wang, X., Xu, X., Sun, H., & Chen, X. (2010). Investigation of the interaction between endocrine disruptor bisphenol A and human serum albumin. *Chemosphere*, 80(9), 1075–1080.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.076>

Xu, H., Lv, L., Hu, S., & Song, D. (2010). High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2371–2375.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.068>

Yanishlieva, N. V., Marinova, E., & Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(9), 776–793.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>

Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B., & Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106(3), 929–936.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.006>

Yucel U (2016) Intelligent Packaging. In: Reference Module in Food Science. Elsevier.

Zhang, C., Suen, C. L., Yang, C., & Quek, S. Y. (2017). Food Science , School of Chemical Sciences , The University of Auckland , Private Bag 92019, *Food Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.126>

## 8 Anexos

### 8.1 Anexo I - Revisão Bibliográfica de BPA e BADGE

**Tabela 8.1.** Resumo da revisão bibliográfica referente aos métodos cromatográficos utilizados na determinação de BPA e BADGE

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
RP-HPLC	FLD e MS/MS	FM: formato de amônio 5 mM em água e acetonitrilo/metanol (1/2, v/v) (A/B); Temperatura da coluna: 20-50°C; Fluxo: 0,8 mL/min; Eluição: Gradiente (60-75 % B - 30 min; 10 min de lavagem da fase estacionária (5 % A); 60 % B a 30°C - 10 min); $\lambda$ excitação: 275 nm; $\lambda$ emissão: 305 nm; Ionização: Positiva; Potencial capilar: 4000 V; 10 L/min gás de secagem a 350°C; m/z 100-450 ou SIM	BADGE: LOD = 10-30 $\mu\text{g/kg}$ ; LOQ = 33-99 $\mu\text{g/kg}$	Coluna <i>Multospher</i> 100 5-C18ec, (250 x 4mm)	Petersen <i>et al.</i> , 2003
HPLC	FLD	FM: água/acetonitrilo (A/B); Fluxo: 1 mL/min; Injeção: 50,0 $\mu\text{L}$ ; Eluição: Gradiente (70 % A e 30 % B - 0 min; 20 % A e 80 % B - 20 min; finalizando com 100 % B); Temperatura da coluna: 35°C; $\lambda$ excitação: 230 nm; $\lambda$ emissão: 305 nm	BFDGE: 2.4 $\mu\text{g/kg}$ ; BADGE: 3.4 $\mu\text{g/kg}$	Coluna <i>Kromasil RP</i> (150 x 4,0 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	Cabado <i>et al.</i> , 2008
GC	MS	GC-MS (espectrômetro de massa com quadrupolo); Programa de temperatura do GC (65°C - 2 min; 65°C-160°C - 15°C/min; 160°C-170°C - 3°C/min; 170°C-310°C - 10°C/min; 310°C - 10 min); Volume de Injeção: 2 $\mu\text{L}$ ; Modo de injeção: <i>Split</i> , a 290°C; Gás de transporte: Hélio	BPA (ng/L): LOD = 21 (EC) and 33 (UE); LOQ (ng/L): 69,3 (EC) e 108,9 (UE)	Coluna <i>I.D. DB-5MS</i> 30 m x 0,25 mm; espessura da película 0,25 $\mu\text{m}$	Fasano <i>et al.</i> , 2012

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
LC	MS/MS	FM: solução de formato de amónio 0,01 M/metanol (A/B); Gradiente: 25 % A/75 % B - 10 min; 25 % A/75 % B - 1 min; 75 % B-95 % B, até 5 % A/95 % B - 3 min; 5 % A/95 % B - 1 min; 95 % B-75 %, até 25 % A/75 % B - 3 min; equilíbrio até 25 % A/75 % B; Fluxo: 0,2 mL/min; modo de detecção: MRM; polaridade positiva; temperatura da fonte: 450°C; Gás de cortina: 25 psi; Gás nebulizador: 60psi; Gás turbo: 40psi; Voltagem iónica: 5000V; Gás: Azoto puro 99 %	BADGE e derivados: LOD = 0,5-3,1 µg/kg; LOQ = 1,8-10,3 µg/kg	Coluna de Fase Reversa <i>Sinergy MAX-RP</i> (100 x 2,0 mm; 2,5 µm)	Míguez <i>et al.</i> , 2012
HPLC	DAD, FLD e MS/MS	FM: água/acetonitrilo (A/B); Fluxo: 1 mL/min; Injecção: 20,0 µL; Eluição: Gradiente (30 % B - 1 min; 30 % - 95 % B - 3 min; 95 % B - 4,0 min; 95 % - 30 % B - 1 min; 30 % B - 1 min); HPLC acoplado a DAD: λ excitação: 230 nm; λ emissão: 254 nm; HPLC acoplado a FLD: λ excitação: 230 nm; λ emissão: 315 nm; HPLC com MS/MS: triplo quadrupolo no modo de monitorização de múltiplas reações.	LOD = 0,26 µg BPA/kg de tomate; LOD = 0,09 µg BPA/kg de tomate	Coluna de aço inoxidável <i>Microsorb 300 - C18</i> (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Errico <i>et al.</i> , 2014
HPLC	PDA	FM: acetonitrilo/água (40:60, v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura da coluna: 40°C	-	<i>Inertsil ODS-3</i> (4,6 x 250 mm; 5 µm)	Sungur <i>et al.</i> , 2014

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
LC	FLD e MS/MS	FM: acetonitrilo/água (60/40); Fluxo: 0,5 mL/min; Injeção: 20,0 µL; Eluição: Isocrático; λ excitação: 273 nm; λ emissão: 300 nm; Triplo quadrupolo MS, BPA e BPB ionização negativa; BADGE e BFDGE ionização positiva	Atum: BADGE: LOD = 2,2 ng/g e LOQ = 7,5 ng/g; Óleo de atum: LOD = 2,3 ng/g e LOQ = 7,8 ng/g; Aquoso: LOD = 2,4 ng/g e LOQ = 7,9 ng/g	Coluna HPLC C18 <i>RP Ascentis</i> (250 x 4,60 mm, 5 µm)	Fattore <i>et al.</i> , 2015
HPLC	UV	FM: acetonitrilo/água (40:60, v/v); Eluição: Isocrático; Fluxo: 0,5 mL/min; Temperatura da Coluna: 25°C; Volume de injeção: 10 µL; λ de detecção = 225 nm	BPA: LOD = 1 µg/L; LOQ = 3,3 µg/L	Coluna <i>Xbridge</i> C18 (150 mm x 3,0 mm, 3,5 µm) com uma pré-coluna <i>Xbridge</i>	Xia <i>et al.</i> , 2015
LC	MS/MS	FM: água/ácido fórmico (99,8:0,2, v/v) e acetonitrilo/água/ácido fórmico (97,8:2:0,2, v/v/v) (A/B); Gradiente linear: 55 % A/45 % B - 0 min; 55 % A/45 % B - 0,5 min; 25 % A/75 % B - 9,5 min; 2 % A/98 % B - 10,5 min; 2 % A/98 % B - 12,0 min; 55 % A/45 % B - 12,5 min; 55 % A/45 % B - 18 min; Fluxo: 240 µL/min; Volume de injeção: 10 µL; Temperatura da coluna: 25°C; Voltagem capilar: 3,60 kV; Voltagem do cone: 70V; Temperatura de dissolução: 350°C; Temperatura da fonte: 130°C; Fluxo de gás do cone: 80 L/h; Fluxo de gás de dissolução: 750 L/h; Nebulizador, dissolução e gás do cone: Nitrogénio; Multiplicador de voltagem: 650 V; Energia Iónica: 0,5 V (1 e 2).	BPA (µg/kg): LOD = 0,073 LOQ = 0,243	Coluna Pentafluorofenilpropil <i>Ascentis Express</i> F5 (100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm) com uma pré-coluna F5 (5 mm x 2,1 mm, 2,7 µm); coluna <i>XBridge</i> C18 (50 mm x 2,1 mm, 2,5 µm); coluna <i>Ascentis Express</i> C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm)	Regueiro <i>et al.</i> , 2015

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
GC	MS	Rampa de temperatura (120°C-200°C - 20°C/min; 200°C - 2 min; 200°C-280°C - 10°C/min; 280°C - 5 min; 280°C-310°C - 20°C/min; 310°C - 3 min); Volume de Injeção: 1 µL; Modo de injeção: <i>Split</i> , a 250°C; Gás de transporte: Hélio.	BPA (ng/g): Mel: LOD = 0,128 e LOD = 0,428; Simulante Alimentar: LOD = 0,0506 e LOQ = 0,169	Coluna capilar DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Cesen <i>et al.</i> , 2016
UPLC	FLD	FM: água/acetoneitrilo (A/B); TC: 25°C; Fluxo: 0,5 mL/min; Injeção: 5,0 µL; Eluente: Gradiente (50 % B - 0,50 min; 50 %-95 % B - 5,5 min; 95 % B - 3,0 min; 20 % B - 20 min; 50 % B - 40 min); λ excitação: 275 nm; λ emissão: 305 nm	LOQ = 0,5 ng/mL; LOD = 0,15 ng/mL	Coluna de aço inoxidável <i>Ascentis Express RP-Amide</i> (4,6 mm x 75 x 2,7 µm partículas)	Gallo <i>et al.</i> , 2017
UHPLC	MS/MS	FM: formato de amónia 0,001 mM/metanol (A/B); Gradiente: Linear (60 % A/40 % B - 0 min; 60 % A/40 % B - 2 min; 40 % A/60 % B - 9 min; 15 % A/85 % B - 12 min; 15 % A/85 % B - 13 min; 60 % A/40 % B - 14 min; 60 % A/40 % B - 15 min); Fluxo: 0,2 mL/min; Volume de injeção: 10 µL; Temperatura da coluna: 40°C. MS: Modo ESI negativa e positivo, sob as condições: Temperatura do gás seco = 220°C, Fluxo do gás seco = 14 L/min, Pressão do gás nebulizador = 20 Psi, Temperatura do gás de revestimento = 300°C, Fluxo do gás de revestimento = 11 L/min, Voltagem do capilar = 3000 V, Voltagem da seringa = 1500 V, Tempo do ensaio = 20 min, modo MRM.	BPA (µg/kg): LOD = 0,08 e LOQ = 0,50 BADGE (µg/kg): LOD = 0,02 e LOQ = 0,50	ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm)	Cheng <i>et al.</i> , 2017

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
UPLC	MS/MS	FM: 0,05 % amoníaco/metanol (A/B); Volume de injeção: 20 µL; Temperatura da coluna: 30°C; Eluição: Gradiente (60 % A/40 % B - 1min; 40 %-70 % B, até 30 % A/70 % B - 0,5 min; 70 %-100 % B, até 0 % A/100 % B - 1,5 min; 100 %-40 % B, até 60 % A/40 % B - 0,5 min; 60 % A/40 % B - 2 min); Fluxo: 0,2-0,3 mL/min; Triplo quadrupolo MS, Modo iônico negativo; voltagem capilar: 1,5 kV; Gás de dessolvatação: Azoto 99,9 % (Fluxo - 50 e 800 L/h); Gás de colisão: Árgon de ultra pureza (Fluxo: 0,2 mL/min)	BPA: LOD = 0,4 µg/kg; LOQ = 1,0 µg/kg	Coluna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) e coluna de retardamento (coluna C18, 50 mm x 2,00 mm, 3 µm)	Xian <i>et al.</i> , 2017
HPLC	FLD	FM: 0,1% ácido fórmico/acetonitrilo (A/B); Fluxo: 1 mL/min; Injeção 20,0 µL; Eluição: Gradiente (55 % A/45 % B; 45 %-55 % B, até 45 % A/55 % B - 7 min; 45 % A/55 % B - 17 min; 55 %-45 % B, até 55 % A/45 % B; 55 % A/45 % B - 4 min); λ excitação: 215-245 nm; λ emissão: 295-315 nm; Temperatura da coluna: 35°C	LOD (µg/kg): BPA = 3,1; BADGE = 2,3; BADGE 2H <sub>2</sub> O = 1,3; LOQ (µg/kg): BPA - 9,8; BADGE.2H <sub>2</sub> O - 3,8; BADGE - 7.8	Coluna Waters Xcharge C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å)	Xiong, <i>et al.</i> , 2017
GC	MS/MS	Temperatura da porta de injeção: 250°C; Volume de injeção: 1 µL; Modo de Injeção: <i>Split</i> ; Gás de transporte: Hélio 99,9 %; Fluxo: 1,4 mL/min; Gradiente de temperatura (150°C - 1 min; 20°C/min até 270°C - 1,67 min; 30°C/min até 310°C - 4 min); Impacto dos eletrões (70 eV); Gás de colisão: Árgon 99,9 %	LOD = 0,1-1,2 ng/g; LOQ = 0,5-4 ng/g	ZB-5MS coluna capilar (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	García-Córcoles <i>et al.</i> , 2017

Método analítico	Detector	Condições cromatográficas	LOD e LOQ	Coluna Analítica	Referências
<p><b>Legenda:</b> <math>\lambda</math> - Comprimento de Onda; <b>BADGE</b> - Éter Diglicidílico do Bisfenol A; <b>BFDGE</b> - Éter Diglicidílico do Bisfenol F; <b>BPA</b> - Bisfenol A; <b>DAD</b> - Detetor de Díodos; <b>EC</b> - Condições Extremas; <b>ESI</b> – Ionização por Eletrospray; <b>FLD</b> - Detetor de Fluorescência; <b>FM</b> - Fase Móvel; <b>GC</b> - Cromatografia Gasosa; <b>HPLC</b> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; <b>LC</b> - Cromatografia Líquida; <b>LOD</b> - Limite de Detecção; <b>LOQ</b> - Limite de Quantificação; <b>MRM</b> - Monitorização de Reações Múltiplas; <b>MS</b> - Espectrofotometria de Massa; <b>MS/MS</b> - Espectrofotometria de Massa em Tandem; <b>PDA</b> - Detetor de Fotodíodos; <b>RP-HPLC</b> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa; <b>SIM</b> - Monitorização Seletiva de Iões; <b>SPE</b> - Extração de Fase Sólida; <b>T</b> - Temperatura; <b>UE</b> - Extração Ultrassónica; <b>UHPLC</b> - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência; <b>UPLC</b> - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.</p>					



**Tabela 8.2.** Resumo da revisão bibliográfica referente à determinação de BPA e BADGE vs materiais em contato com o alimento.

Material em Contato com o Alimento	Alimento ou Simulador	Método de Extração/Solvente	Local e Período de recolha das amostras	Níveis de Migração	Conclusões do Estudo	Referências
Folha de alumínio e um filme de poliolefina	Simuladores de alimentos gordurosos, goulash, batatas, carne de porco enlatada, milho doce e atum em água	C18ec SPE / acetoneitrilo	-	BADGE (e derivados): 1680-2340 µg/kg	A migração de BADGE e derivados excedeu o limite de 1 mg/kg (1680-2340 µg/kg) em todos os lotes investigados. Foi desenvolvido um método válido e rápido para a identificação e quantificação de BADGE e derivados.	Petersen <i>et al.</i> , 2003
Lata	Frutos do mar (mexilhões, cavala, sardinha, bacalhau, atum)	Extração líquida, centrifugação e filtração/ <i>n</i> -heptano, acetoneitrilo	Mercados locais, Vigo, Espanha	BADGE: 0,020-0,10 mg/kg; BFDGE: 0,032-0,248 mg/kg	O valor de migração mais elevado foi o de alimentos gordurosos (mexilhões - 0,74 mg BFDGE/kg e 0,34 mg BADGE/kg, em molho de pepino vermelho). A migração de BADGE não excedeu os limites da legislação europeia. Houve migração de BFDGE do verniz para os alimentos marinhos, apesar de não permitido pela legislação europeia.	Cabado <i>et al.</i> , 2008
Latas, tampa de marmelada, embalagem de iogurte, prato de poliestireno, tetina, bolsa de pão, filme, biberon, plástico asséptico, papelão	Simuladores de Alimentos: água destilada, ácido acético a 3% (m/v) e etanol a 15% (v/v)	SPE com cartuchos / hexano, diclorometano, metanol e água para HPLC	-	BPA (ng/L) – Lata de atum ao natural 824; Saco de pão: 189; Garrafa infantil: 404; Embalagem de marmelada, Filme, Tetrapack, prato de polistireno e tetina: < LOD; óleo da lata de atum, Embalagem de iogurte, plástico que	Todas as amostras demonstraram migração abaixo dos SML e OML estabelecidos. O plástico que reveste as garrafas de vinho obteve o mais elevado nível de migração, apesar de não haver contato do material com o vinho, e de não haver BPA. As latas de atum ao natural exibiram o maior valor de concentração de BPA (824 ng/L).	Fasano <i>et al.</i> , 2012

Material em Contato com o Alimento	Alimento ou Simulador	Método de Extração/Solvente	Local e Período de recolha das amostras	Níveis de Migração	Conclusões do Estudo	Referências
laminado (tetrapack) e tampa de plástico				reveste garrafa de vinho: Não detetado		
Lata	Mexilhões, biqueirão, Sardinhas, Cavala e Atum	Extração líquido-líquido, centrifugação e filtração com filtros de nylon PVDF / 1:1 acetoneitrilo: solução de <i>n</i> -hexano	Supermercados e áreas comerciais em Lugo, Espanha	Atum enlatado (µg/kg): BADGE.H <sub>2</sub> O - 120; BADGE.2H <sub>2</sub> O - 111-625; BADGE.HCl.H <sub>2</sub> O - 18-87	Foi desenvolvido um método de LC-MS/MS para identificar BADGE e BFDGE. Em 90,2 % das amostras BADGE e BFDGE não foram detetados em peixes enlatados. Nos quatro casos de deteção, os níveis não atingiram os limites estabelecidos pela UE.	Míguez <i>et al.</i> , 2012
Lata	Tomate em conserva	SPE / <i>n</i> -hexano, acetona	Supermercados de Nápoles, sul de Itália.	BPA: Tomates descascados: 0,31-3,8 µg/kg; Tomates <i>cherry</i> : 0,9-2,21 µg/kg; Pasta de tomate: 0,39-1,82 µg/kg	Confirmação da migração de BPA de latas de resinas epóxi para tomates. Níveis foram inferiores do que em outros produtos enlatados (frutos, vegetais, carne) e abaixo dos limites da legislação europeia.	Errico <i>et al.</i> , 2014
Caixas de papel com superfície interna revestida com verniz; Jarras de vidro com tampas cobertas de filme plástico; Latas de metal	Leite, sumos de fruta, natas, pudim e atum; Ervilhas, guarnição, milho, pasta de tomate, pasta de pimentos, pickles, cogumelos e feijões.	Bebidas: Desgaseificação e SPE / acetoneitrilo e água; Alimentos: Extração líquida e filtração / Acetoneitrilo e água	Mercados locais em Hatay, Turquia	BPA (µg/kg) – Alimentos enlatados: 21,86-1858,71; Alimentos em caixas de papel: 36,48-554,69; Alimentos em jarros de vidro: "não detetado" - 399,21	As maiores concentrações de BPA foram encontradas em amostras de feijão (650,15 µg/kg em média). Estas foram as únicas acima do limite de migração da União Europeia de 0,6 mg de BPA/kg de alimento. Em conclusão, é possível afirmar que o BPA não é um fator de risco para a saúde humana na Turquia, atualmente.	Sungur <i>et al.</i> , 2014

Material em Contato com o Alimento	Alimento ou Simulador	Método de Extração/Solvente	Local e Período de recolha das amostras	Níveis de Migração	Conclusões do Estudo	Referências
Lata	Atum; conservas de atum em óleo; Atum enlatado em meio aquoso	SPE / <i>n</i> -hexano, acetoneitrilo	Mercados locais, Nápoles, sul de Itália.	19,1-187,0 ng/g de BP em matriz de atum; 6,3-66,9 ng/mL em óleo de atum; Atum em água não possui BP	Níveis de bisfenóis encontrados foram abaixo dos limites legais.	Fattore <i>et al.</i> , 2015
Polietileno de Baixa Densidade	Água destilada, etanol a 95% (v/v), ácido acético a 3% (m/v) e acetoneitrilo	Extração refluxo; Extração líquida bilateral / Etanol; Simulador alimentar	-	BPA (mg/L): (com 2,66 mg/g de concentração inicial de BPA, a 80°C, durante 6000 s) – Água destilada: 21,80; Ácido acético a 3 % (m/v): 22,80; Etanol a 95 % (v/v): 21,16	A concentração máxima de BPA encontrada nos simuladores alimentares foram cerca de 23 mg/L. Os fatores com efeitos na migração foram a temperatura e o simulador. Este modelo de abordagem promove uma melhor compreensão da migração de BPA para os simuladores alimentares.	Xia <i>et al.</i> , 2015 e Informação de Suporte
Bandejas plásticas, latas	Refeições pré-confeccionadas: Prato principal (peixe ou carne), um componente com amido (arroz/batatas/maisa), vegetais e/ou um molho; pizza congelada; Ravioli enlatado	Disrupção da amostra com areia/acetoneitrilo: metanol (80:20, v/v); Limpeza com SPE com cartuchos PSA/metanol: ácido acético (98,5:1,5, v/v)	Supermercados na Bélgica, de fevereiro a dezembro de 2014	BPA: <LOQ-17,7 µg/kg em raviolis de carne enlatados	Foi desenvolvido um método de LC-MS/MS para a determinação de BPA. É adequado para refeições pré-confeccionadas, como para a análise de bisfenóis em outros alimentos complexos. BPA foi detetado em todas as amostras, até 17,7 µg/kg. Está de acordo com os limites estabelecidos pela UE.	Regueiro <i>et al.</i> , 2015
Frasco de vidro, tampa de metal revestido, garrafa de plástico, bolsa de plástico,	Mel e Etanol a 10% (v/v) - Simulador alimentar	Mel: Filtração e SPE com cartuchos / acetato de etilo, acetoneitrilo, metanol e água ultrapura; Simulador alimentar:	Supermercados de vários países da Europa e outros, produtores	BPA - Mel: Em plásticos ou saquetas de folha: 0,909-18,6 ng/g; Em jarros com tampa: < LOD (com uma exceção, de 0,475 ng/g).	Os compostos mais frequentemente detetados foram o BPA (27 de 36 amostras). O SML para o BPA é de 600 ng/g. Assim sendo, nenhuma amostra de mel continha concentrações acima do SML. O valor de TDI estabelecido para o BPA (4 µg kg/ dia)	Cesen <i>et al.</i> , 2016 e Informação de Suporte

Material em Contato com o Alimento	Alimento ou Simulador	Método de Extração/Solvente	Local e Período de recolha das amostras	Níveis de Migração	Conclusões do Estudo	Referências
tubo de plástico, recipiente de plástico, folha de polímero laminado		Diluição com água ultrapura, filtração e SPE com cartuchos / acetato de etilo, acetonitrilo, metanol e água ultrapura.	de mel esloveno, em 2015 e 2016.	Simulador alimentar: Em plásticos ou saquetas: < LOD - 3,85 ng/mL; Em jarros com tampa: 3,95 - 42,2 ng/mL.	não foi excedido por nenhuma das amostras de mel testadas.	
Lata	Bebidas Energéticas	SPE / Solução 2% Ácido acético em metanol, acetonitrilo, água Milli Q	Supermercados de Nápoles e províncias, sul de Itália. Junho-Novembro de 2015.	BPA (ng/mL): 0,50-3,3; BADGE (ng/mL): 0,50-19,4	Níveis de migração foram concordantes com os limites da legislação europeia. 42,5 % foram contaminados com BPA, numa concentração de 3,3 ng/mL, e 22,5 % foram contaminados com BADGE (19,4 ng/mL). O consumo de bebidas energéticas conduz à ingestão de níveis baixos de bisfenóis.	Gallo <i>et al.</i> , 2017
Latas e tampas de metal	Leites comerciais, bebidas lácteas e iogurtes	1 % ácido acético em acetonitrilo, seguido de purificação com 190 mg de C18 e 390 mg de PSA.	Mercado local, Pequim, China	Em bebidas lácteas BPA (µg/kg): 33,8-127,2; BADGE (µg/kg): 20,2-199,7	Foi desenvolvido um método simples, rápido e universal de UHPLC-MS/MS para a determinação de bisfenóis e derivados. BPA e BADGE apenas foram detetados em amostras de bebidas lácteas, com valores máximos de 127 µg/kg para o BPA e 200 µg/kg para BADGE. Estes resultados estão abaixo do valor limite de 0,6 mg/kg estabelecido pela UE.	Cheng <i>et al.</i> , 2017
Garrafas de Policarbonato	Óleos comestíveis	Extração de fase micro sólida dispersiva (DMSPE) / Metanol, água e 0,05 % água com amónia (60:38:2, v/v/v)	Supermercados locais, Guangzhou, China	BPA: 98,9 µg/kg e 146,2 µg/kg	Um método inovador de análise ao BPA foi desenvolvido. BPA foi detetado em duas amostras (98,9 e 146,2 µg/kg) de garrafas de policarbonato. As concentrações de BPA aumentaram com o tempo de armazenamento.	Xian <i>et al.</i> , 2017

Material em Contato com o Alimento	Alimento ou Simulador	Método de Extração/Solvente	Local e Período de recolha das amostras	Níveis de Migração	Conclusões do Estudo	Referências
Latas, Garrafas	Leite	Ultrassom e centrifugação / ácido fórmico 0,1 % e acetoneitrilo com o uso da técnica QuEChERS.	Supermercados e fazendas de produção de leite em Lanzhou, China	BPA: 13,74 µg/kg; BADGE.2H <sub>2</sub> O: 15,80 µg/kg	Os compostos mais frequentemente detetados foram o BPA (27 de 36 amostras). O SML para o BPA é de 600 ng/g. Assim sendo, nenhuma amostra de mel continha concentrações acima do SML. O valor de TDI estabelecido para o BPA (4 µg kg/ dia) não foi excedido por nenhuma das amostras de mel testadas.	Xiong <i>et al.</i> , 2017
Plástico	Comida para bebé pronta a comer	Extração sólido-líquido / Acetonitrilo seguido de uma limpeza com solventes dispersivos de SPE (C18 e PSA) e sulfato de magnésio	Supermercados locais, Granada, Espanha	BPA: 1,1 ng/g (1/ amostra); BPS: 11,7-49,2 ng/g (5 amostras)	Foi desenvolvido um método de GC-MS/MS para a determinação de BPA. É adequado para refeições pré-confeccionadas, como para a análise de bisfenóis em outros alimentos complexos. BPA foi detetado em todas as amostras, até 17,7 µg/kg. Está de acordo com os limites legislados.	García-Córcoles <i>et al.</i> , 2017

**Legenda:** **BADGE** - Éter Diglicidílico do Bisfenol A; **BADGE.2H<sub>2</sub>O** - Éter Diglicidílico do Bisfenol A bis(2,3-dihidroxiopropil); **BADGE.H<sub>2</sub>O** - Éter Diglicidílico do Bisfenol A (2,3-dihidroxiopropil); **BADGE.HCl.H<sub>2</sub>O** - Éter Diglicidílico do Bisfenol A (3-cloro-2-hidroxiopropil); **BFDGE** - Éter Diglicidílico do Bisfenol F; **BPA** - Bisfenol A; **BPS** - Bisfenol S; **FLD** - Detetor de Fluorescência; **GC** - Cromatografia Gasosa; **HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; **LC** - Cromatografia Líquida; **LOD** - Limite de Detecção; **LOQ** - Limite de Quantificação; **MS/MS** - Espectrofotometria de Massa em Tandem; **OML** - Limite de Migração Global; **PSA** - Amina Primária e Secundária; **PVDF** - Fluoreto de Polivinilideno; **QuEChERS** - Método de Extração Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro; **RP** - Fase Reversa; **SML** - Limite de Migração Específico; **SPE** - Extração de Fase Sólida; **T** - Temperatura; **TDI** - Ingestão Diária Tolerável; **UE** - União Europeia **UHPLC** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência; **UPLC** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

## 8.2 Anexo II - Questionário sobre Hábitos de Consumo e Embalagens Inovadoras

### Consumo de produtos em latas de conserva

Este questionário foi realizado no âmbito do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. O questionário divide-se em duas secções distintas:

- A primeira secção tem como objectivo a análise dos hábitos de consumo de alimentos enlatados pela população portuguesa. Os dados obtidos serão utilizados para a avaliação do risco associado à exposição a potenciais contaminantes alimentares com origem em latas de conserva.

- A segunda secção pretende avaliar o conhecimento dos consumidores no que se refere às novas embalagens já existentes no mercado (embalagens activas e inteligentes).

O questionário tem uma duração de aproximadamente 10 minutos.

A informação que partilhar será totalmente confidencial, de uso apenas estatístico.

Por favor responda com veracidade às questões seguintes, tendo em atenção a possibilidade de assinalar mais que uma opção.

\* Required

#### Informação Pessoal

##### Nacionalidade \*

Your answer

##### Sexo \*

Masculino

Feminino

##### Idade \*

Your answer

##### Peso (em Kg) \*

É um dado importante no cálculo do risco associado à exposição a contaminantes alimentares

Your answer

##### Código Postal \*

(por exemplo, 1111-111 Lisboa)

Your answer

##### Escolaridade \*

4ª Ano

9º Ano

12º Ano

Licenciatura

Mestrado

Doutoramento

Other: \_\_\_\_\_

##### Trabalha ou estuda na área da saúde? \*

(ex: medicina, enfermagem, nutrição)

Sim

Não

NEXT

Page 1 of 11

## Hábitos alimentares

1 - Consome habitualmente alimentos enlatados? (ex: atum em lata, sardinha em lata, etc...) \*

- Sim
- Não

BACK

NEXT

Page 2 of 11

## Hábitos Alimentares

2 - Que alimentos enlatados consome? \*

(Pode assinalar mais que uma opção)

- Polpa de tomate
- Cenouras
- Fruta em calda
- Feijão
- Grão
- Ervilhas
- Atum
- Salsichas
- Sardinha
- Milho
- Other: \_\_\_\_\_

3 - Dos alimentos identificados na questão anterior, qual é o que consome com maior frequência? \*

Choose ▾

4 - Qual(is) a(s) razão(ões) para o consumo de conservas? \*

(Pode assinalar mais que uma opção)

- Gosta do sabor
- O preço é acessível
- São de preparação rápida
- Têm um bom valor nutricional
- Other: \_\_\_\_\_

### 5 - Qual é o modo de preparação? \*

(Pode assinalar mais que uma opção)

- Consome diretamente da lata
- Remove da lata para o prato, e consome
- Remove da lata, confeciona e depois consome
- Aquece no microondas, depois de remover da lata, e consome
- Aquece no microondas, ainda na lata, e depois consome
- Other: \_\_\_\_\_

BACK

NEXT

Page 3 of 11

## Latas de conserva de Atum

As perguntas seguintes avaliam o seu consumo de Atum em lata

### 6 - Consume atum enlatado? \*

- Sim
- Não

BACK

NEXT

Page 4 of 11

## Latas de conserva de Atum

### 7 - Qual o meio de conserva em que compra o Atum? \*

(Pode escolher mais que uma opção)

- Atum em óleo
- Atum em azeite
- Atum em água (ao natural)
- Other: \_\_\_\_\_

### 8 - Nos últimos três meses, que marcas de atum em lata adquiriu? \*

(Pode assinalar mais que uma opção)



Marca Jumbo Auchan



Pescador



Bonito dos Açores



Conserva Santos





Bom Petisco



Tenório



Marca Pingo doce



Ramirez



Marca Continente



Alva



Marca Lidl Nixe



Marca Jumbo Polegar



Marca Mini-Preço Dia



Pitéu



Calvo



General



Santa Catarina



Lusiadas



Real do Mar



Marca É Continente

Other: \_\_\_\_\_

9 - Das marcas referidas, qual a que consome mais? \*

Choose ▼

10 - Nos últimos três meses, qual a quantidade que consumiu por refeição? \*

Uma lata (pequena) = 120g de peso líquido

- Menos que meia lata de Atum
- Meia lata de Atum
- Uma lata de Atum
- Uma lata e meia de Atum
- 2 latas de Atum
- Mais que 2 latas de Atum

11 - Nos últimos três meses, qual a frequência do consumo? \*

- A todas as refeições
- Uma vez por dia
- Quatro vezes por semana
- Duas vezes por semana
- Uma vez por semana
- Uma vez por mês
- Other: \_\_\_\_\_

BACK

NEXT

Page 5 of 11

## Compostos químicos

12 - Tem conhecimento que existe migração de compostos químicos das latas para os alimentos enlatados? \*

- Sim
- Não

13 - Que efeitos terão para a saúde humana? \*

- Positivos
- Neutros
- Negativos

14 - Tem conhecimento de compostos químicos designados por bisfenóis (Bisfenol A, Bisfenol S, BADGE)? \*

- Sim
- Não

BACK

NEXT

Page 6 of 11

## Bisfenóis

15 - Onde podem estar presentes estes compostos e derivados?

\*

(Pode assinalar mais que uma opção)

- Interior e tampa de conservas (latas de metal)
- Revestimento de tanques e aeronaves
- Biberões
- Tintas
- Embalagens alimentares de plástico
- Aplicações dentárias, cirúrgicas e protésicas

16 - Qual a consequência da ingestão destes compostos acima do valor diário tolerável (TDI)? \*

- Inflamação do trato gastrointestinal
- Desregulação endócrina
- Dermatite
- Paralisia cerebral
- Não tenho conhecimento

BACK

NEXT

Page 7 of 11

## Embalagens alimentares

Esta secção foca-se nos recipientes em que são vendidos os alimentos

17 - Em relação ao rótulo, sente que recebe toda a informação necessária do produto? \*

- Sim
- Não

18 - Se o mesmo alimento for vendido em frascos de vidro e latas de metal, qual preferiria? \*

- Latas de metal
- Frascos de vidro

19 - No caso de ter seleccionado a opção "latas de metal", qual (is) a(s) razão(ões) da escolha?

- Embalagens menos propensas a partirem-se
- Maior prazo de validade
- Aspeto da embalagem
- Preço mais acessível
- Other: \_\_\_\_\_

## 20 - Que alimentos consome em frascos de vidro? \*

(Pode assinalar mais que uma opção)

- Milho
- Compota
- Salsichas
- Grão
- Cenouras
- Feijão
- Polpa de tomate
- Sardinha
- Atum
- Fruta em calda
- Other: \_\_\_\_\_

## 21 - No prazo de validade, conhece a diferença entre "consumir até" e "consumir preferencialmente antes de"? \*

- Sim
- Não
- Não existe diferença

BACK

NEXT

Page 8 of 11

## Prazo de validade

### 22 - Qual é a diferença entre "consumir até" e "consumir preferencialmente antes de"?

(Escolha as 2 opções verdadeiras, de modo a completar a resposta)

- "consumir até" é uma data a partir da qual o produto está seguro para consumo
- "consumir até" é uma data a partir da qual o produto apenas perde a frescura, existindo ainda segurança
- "consumir até" é uma data a partir da qual não é seguro o consumo do produto
- "consumir preferencialmente antes de" é um prazo a partir do qual o alimento perde a frescura, mas existe segurança para o consumo
- "consumir preferencialmente antes de" é uma data a partir da qual o produto adquire frescura
- "consumir preferencialmente antes de" é um prazo a partir do qual não é seguro o consumo do produto

BACK

NEXT

Page 9 of 11

## Recipientes Alimentares

Aqui serão apresentadas algumas perguntas sobre os mais recentes desenvolvimentos do armazenamento de alimentos

### 23 - Sabe o que são Embalagens Inteligentes? \*

- Sim
- Não
- Já ouvi falar, mas não sei o que são

### 24 - Qual é a sua função principal?

Responda apenas se escolheu "Sim" na pergunta anterior

- Informar o consumidor sobre o estado do alimento
- Interação com o alimento
- Extensão da validade do alimento
- Proteção do Meio Ambiente

### 25 - Já ouviu falar em Embalagens Ativas? \*

- Sim
- Não
- Já ouvi falar mas não sei o que são

### 26 - Qual é a sua função principal?

Responda apenas se escolheu "Sim" na pergunta anterior

- Extensão do prazo de validade do alimento
- Informar o consumidor sobre o estado do alimento
- Diminuição do prazo da validade do alimento
- Proteção do Meio Ambiente

BACK

NEXT

Page 10 of 11

## Obrigado pelo seu tempo!

Na eventualidade de querer saber mais sobre os bisfenóis e os perigos da sua ingestão ou sobre embalagens ativas e inteligentes, deixe por favor o seu e-mail no campo abaixo. Ser-lhe-á brevemente enviada informação sobre o tema, bem como o resultado estatístico deste questionário.

### E-mail

Your answer

BACK

SUBMIT

Page 11 of 11

### 8.3 Anexo III - Comunicações Nacionais sob a forma de *Poster*

**F. Castro, M. Andrade, A. Sanches-Silva, M. Vaz, F. Vilarinho.** Embalagens ativas, possível solução para a oxidação lipídica. 5º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura – “Perigos Microbiológicos – Estratégias e Perspetivas” (SPASS 2018), Lisboa, Portugal. Setembro 2018.

**F. Castro, M. Andrade, A. Sanches-Silva, M. Vaz, F. Vilarinho.** Avaliação dos hábitos de consumo e grau de conhecimento sobre embalagens alimentares da população portuguesa. 11ª Reunião Anual PortFIR - Partilhar e cooperar para uma alimentação saudável, Lisboa, Portugal. Outubro 2018.

**F. Castro, M. Andrade, A. Sanches-Silva, M. Vaz, F. Vilarinho.** Alecrim vs Chá Verde: comparação do poder antioxidante entre dois extratos naturais. 11ª Reunião Anual PortFIR - Partilhar e cooperar para uma alimentação saudável, Lisboa, Portugal. Outubro 2018.

## 8.4 Anexo IV - Comunicações Nacionais sob a forma de *Poster* – Abstracts

### EMBALAGENS ATIVAS, POSSÍVEL SOLUÇÃO PARA A OXIDAÇÃO LIPÍDICA

**Frederico Castro**<sup>1,2</sup>; Mariana A. Andrade<sup>1,3</sup>; A. Sanches Silva<sup>4,5</sup>, M. Fátima Vaz<sup>6</sup>, Fernanda Vilarinho<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal;

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal;

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Pólo III - Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba, 3000-354 Coimbra, Portugal;

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Vairão, Vila do Conde, Portugal;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), ICETA, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

<sup>6</sup> IDMEC, Instituto Superior Técnico, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Nas últimas décadas, tem havido um aumento da necessidade de melhorar a proteção dos alimentos contra diversos fatores externos (variação de temperatura, radiação, agentes patogénicos, entre outros), aumentando consequentemente o tempo de vida útil e segurança destes alimentos [1]. Neste sentido, surgiram as embalagens ativas. O principal propósito deste novo sistema de embalamento prende-se com a interação entre a embalagem e o alimento, através da emissão ou absorção de substâncias entre eles. Com a sustentabilidade em mente, a comunidade científica e a indústria alimentar estão ativamente em busca de biopolímeros para a manufatura de embalagens alimentares, como por exemplo a proteína de soro de leite, obtida do soro de leite, um subproduto da indústria dos laticínios. Filmes à base de proteína de soro de leite são biodegradáveis e edíveis, sendo por isso benéficos para o meio ambiente [1]. Em relação aos compostos ativos incorporados na embalagem, existe atualmente uma procura por aditivos naturais. Extratos de plantas aromáticas representam uma opção válida, sendo que são conhecidos pelo seu poder antioxidante e propriedades antimicrobianas. De facto, a utilização de vários destes extratos, foi aprovada pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e União Europeia [2]. O chá verde tem uma elevada capacidade antioxidante derivada dos seus compostos fenólicos, facto que promove a obtenção dos extratos desta planta, com o propósito de serem incorporados numa embalagem ativa [3].

O objetivo principal deste estudo, foi a verificação da eficácia de um filme à base de proteína de soro de leite incorporado com extrato de chá verde, na possível extensão do "tempo de prateleira" de salmão fresco (alimento rico em gorduras insaturadas).

O filme biodegradável foi constituído de proteína de soro de leite (8 %), glicerol (8 %), extrato de chá verde (1 %) e água. O salmão fresco foi adquirido numa zona comercial de Lisboa, Portugal, cortado em fatias de 35 g e embalado com o filme ativo e com o filme controlo (filme à base de proteína de soro de leite, sem a incorporação de extrato de chá verde), respetivamente. Para determinar a oxidação lipídica natural do salmão, testou-se o nível de oxidação lipídica de fatias não embaladas, mantidas a 5 °C, durante 17 dias, ao abrigo da luz. A oxidação lipídica das amostras embaladas foi avaliada em diferentes tempos de armazenamento (5, 7, 10, 14 e 17 dias) através da determinação do valor de *p*-anisidina e ensaio de TBARS (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). As amostras não embaladas foram avaliadas através dos mesmos testes, em tempos de armazenamento de 3, 5, 7, 10 e 12 dias, respetivamente.

Foram obtidos níveis de oxidação lipídica inferiores nas amostras embaladas com o filme ativo, em comparação com as amostras embaladas com o filme controlo e não embaladas. Estes valores inferiores são traduzidos por valores menores de *p*-anisidina e malonaldeído (MDA).

#### Referências

[1] R. Ribeiro-Santos, N.R. de Melo, M. Andrade, G. Azevedo, A.V. Machado, D. Carvalho- Costa, A. Sanches-Silva, Whey protein active films incorporated with a blend of essential oils: Characterization and effectiveness, *Packag. Technol. Sci.* 31 (2018) 27–40. doi:10.1002/pts.2352.

[2] M.A. Andrade, R. Ribeiro-Santos, M.C. Costa Bonito, M. Saraiva, A. Sanches-Silva,

Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film, *Lwt.* 92 (2018) 497–508. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.041.

---

## AVALIAÇÃO DOS HÁBITOS DE CONSUMO E GRAU DE CONHECIMENTO SOBRE EMBALAGENS ALIMENTARES DA POPULAÇÃO PORTUGUESA

**Frederico Castro**<sup>1,2</sup>; Mariana A. Andrade<sup>1,3</sup>; A. Sanches Silva<sup>4,5</sup>; M. Fátima Vaz<sup>6</sup>, Fernanda Vilarinho<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> INSA, Lisboa, Portugal;

<sup>2</sup> FCUL, Lisboa, Portugal;

<sup>3</sup> FFUC, Coimbra, Portugal;

<sup>4</sup> INIAV, Vila do Conde, Portugal;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), ICETA, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

<sup>6</sup> IDMEC, IST, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

As embalagens alimentares têm como principal função a proteção dos alimentos de fatores que alterem as suas propriedades organolépticas, valor nutricional e segurança microbiológica. Contudo, os materiais utilizados no revestimento das embalagens podem interagir com os alimentos, havendo a migração de determinados compostos para os alimentos [1]. A maioria das latas metálicas usadas para a conserva de alimentos é revestida internamente por um material epóxi-fenólico que tem como base o bisfenol A (BPA) e epicloridrina. Estes dois compostos reagem e produzem uma resina de baixo peso molecular, onde se inclui o éter diglicídico do bisfenol A (BADGE) [2]. Com o avanço da tecnologia, surgiram as embalagens ativas e as embalagens inteligentes. As embalagens ativas podem ser de dois tipos: de emissão ou absorção. Estas têm como função a interação entre a embalagem e o alimento, através da emissão de compostos ou da absorção de gases ou substâncias provenientes do alimento. Em relação às embalagens inteligentes, a sua função principal é monitorizar as condições do alimento e do meio envolvente do alimento e informar o consumidor das mesmas [3].

Este estudo teve como objetivo o levantamento dos hábitos de consumo de latas de conserva numa amostra da população portuguesa e aferir o seu conhecimento sobre embalagens ativas e inteligentes. Foi elaborado um questionário *online* com 26 questões. Dos inquiridos, a maioria era do sexo feminino (66 %), entre os 18 e os 24 anos de idade (62 %), e com formação superior (licenciatura, mestrado ou doutoramento) (76 %). De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que 70 % dos inquiridos consome alimentos enlatados, dos quais aproximadamente 72 % tem preferência por atum. Em relação aos compostos químicos presentes no revestimento das embalagens de conserva, aproximadamente 74 % respondeu não ter conhecimento sobre o bisfenol A e BADGE. No tema das embalagens alimentares, apenas 15 % dos inquiridos tinha conhecimento da função principal das embalagens inteligentes, enquanto 13 % declarou conhecer o objetivo das embalagens ativas.

Com os resultados obtidos, pode afirmar-se que a população portuguesa consome um elevado número de produtos em latas de conserva, nomeadamente o atum, apesar de poucos inquiridos possuírem conhecimento sobre a migração de bisfenóis para os alimentos. Em relação às embalagens alimentares inovadoras, apenas uma pequena fração dos inquiridos tem conhecimento da sua existência e das funções que desempenham.

### Referências

[1] van der Kellen, A. M. P. (2017). Desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de ultra resolução acoplado a um detetor de fluorescência para determinação de bisfenol A em alimentos embalados. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia.

[2] Coulier, L., Bradley, E. L., Bas, R. C., Verhoeckx, K. C. M., Driffield, M., Harmer, N., & Castle, L. (2010). Analysis of Reaction Products of Food Contaminants and Ingredients: Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) in Canned Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4873–4882. <https://doi.org/10.1021/jf904160a>



[3] Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, 19(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011>

## ALECRIM VS CHÁ VERDE: COMPARAÇÃO DO PODER ANTIOXIDANTE ENTRE DOIS EXTRATOS NATURAIS

Frederico Castro<sup>1,2</sup>; Mariana A. Andrade<sup>1,3</sup>; A. Sanches Silva<sup>4,5</sup>, M. Fátima Vaz<sup>6</sup>, Fernanda Vilarinho<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> INSA, Lisboa, Portugal;

<sup>2</sup> FCUL, Lisboa, Portugal;

<sup>3</sup> FFUC, Coimbra, Portugal;

<sup>4</sup> INIAV, Vila do Conde, Portugal;

<sup>5</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), ICETA, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

<sup>6</sup> IDMEC, IST, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

As plantas aromáticas são utilizadas no tratamento de doenças há milhares de anos. Estas plantas têm na sua constituição compostos com propriedades farmacológicas, sendo utilizadas nos dias de hoje na medicina contemporânea [1]. As plantas aromáticas, como o estragão (*Artemisia dracunculus* L.), a sálvia (*Salvia officinalis* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e o chá verde (*Camellia sinensis* L.) exibem atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-tumoral, que advém de fitoquímicos, como as vitaminas, terpenóides, carotenóides e flavonóides. Entre estes fitoquímicos, os compostos fenólicos são os mais abundantes [2]. Os extratos de plantas aromáticas são uma fonte considerável de antioxidantes naturais, que podem ser tão eficazes como os antioxidantes sintéticos. Um elevado número de extratos de plantas aromáticas é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), o que permite a sua utilização no setor alimentar como aditivos [3,4]. Estes extratos podem ser incorporados em filmes ativos, com o propósito de aumentar a vida útil dos alimentos através da inibição da oxidação lipídica e/ou de microrganismos patogénicos [5].

O objetivo deste estudo foi a comparação da atividade antioxidante de extratos de alecrim e chá verde, para uma possível incorporação numa embalagem ativa.

O alecrim foi adquirido seco num estabelecimento comercial da zona de Lisboa, Portugal, enquanto o chá verde foi adquirido já em forma de extrato. O extrato de alecrim foi obtido com etanol através de um processo de extração sólido-líquido. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada através do sistema de inibição do radical DPPH, do teste do branqueamento do  $\beta$ -caroteno, da determinação dos compostos fenólicos totais e da determinação dos flavonoides totais. Foi também avaliado o efeito sinérgico entre os extratos.

Verificou-se que o extrato de chá verde obteve níveis superiores de atividade antioxidante, quando comparado ao extrato de alecrim. Assim, o extrato de chá verde foi escolhido para a incorporação numa embalagem ativa com o objetivo de atrasar ou inibir a oxidação lipídica de alimentos com alto teor lipídico.

### Referências

[1] Máthé, Á., 2009. Medicinal and aromatic plants. *Soils, plant growth and crop production. Encyclopedia of Life Support Systems. Disponível en linea en: [http://www.eolss.net/Sample-Chapters C, 10](http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C,10).*

[2] Wei Zheng, & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, (September 2000). <https://doi.org/10.1021/JF010697N>

[3] Negi, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 7–17 (2012).

[4] Food And Drug Administration (2018) Substances GRAS in food. In: 21 CFR 182. <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text%20idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5>. Acedido a 15 Jun 2018

[5] Sanches Silva, A., Franz, R., Freire, J. M. C. R. U. Z. F., Sendon, R. S., & Losada, P. P. A. L. (2009). Migration and Diffusion of Diphenylbutadiene from Packages into Foods, 10225–10230. <https://doi.org/10.1021/jf901666>

## 8.5 Anexo V - Comunicações Orais Internacionais/Nacionais



**CERTIFICATE OF PARTICIPATION**

**ORAL COMMUNICATION**

*This is to certify that,*

**Frederico V. R. Castro**

*attended the International Meeting on Marine Research 2018 – IMMR'18, held at Peniche, Portugal, July 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> and presented an oral communication during the event.*

**Active packaging as a solution for lipid oxidation**  
*Frederico Vicente Ribeiro Castro, Mariana Alvoco Andrade, Ana Teresa Sanches Silva, Fernanda Vilarinho*

Peniche, 6<sup>th</sup> of July 2018

On behalf of the Organization,

